

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDISMAIR CARVALHO GARCIA

FREQUÊNCIA DE *Brachyspira hyodysenteriae* E *Brachyspira pilosicoli* EM SUÍNOS
DE TERMINAÇÃO NA MESORREGIÃO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ,
BRASIL

PALOTINA

2015

EDISMAIR CARVALHO GARCIA

FREQUÊNCIA DE *Brachyspira hyodysenteriae* E *Brachyspira pilosicoli* EM SUÍNOS
DE TERMINAÇÃO NA MESORREGIÃO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ,
BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Patologia Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aline de Marco Viott

PALOTINA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G216 Garcia, Edismair Carvalho
Frequência de *Brachyspira hyodysenteriae* e
Brachyspira pilosicoli em suínos de terminação na
mesorregião Oeste do estado do Paraná, Brasil /
Edismair Carvalho Garcia - Palotina, 2015.
56p.

Orientador: Aline de Marco Viott
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do
Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal.


1. Colite espiroquetar. 2. Isolamento bacteriano.
3. PCR. I. Viott, Aline de Marco. II. Universidade
Federal do Paraná.

CDU 636.4

PARECER DA BANCA EXAMINADORA

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **EDISMAIR CARVALHO GARCIA**, intitulada: "**FREQUÊNCIA DE *Brachyspira hyobysenteriae* E *Brachyspira pilosicoli* EM SUÍNOS DE TERMINAÇÃO NA MESORREGIÃO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL**", após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua....., completando-se assim todos os requisitos previstos nas normas desta Instituição para a obtenção do Grau de **Mestre em CIÊNCIA ANIMAL**.

Palotina, 19 de Outubro de 2015.



Prof ALINE DE MARCO VIOTT
(Presidente da Banca Examinadora)



Prof DAIANE GULLICH DONIN



Prof GERALDO CAMILO ALBERTON

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Edismair Carvalho Garcia, filho de Edismauro Garcia Freitas e Maisa Carvalho Garcia, nascida no dia 25 de agosto de 1983 na cidade de Jataí, estado de Goiás, Brasil. Ingressou como aluno no curso de Medicina Veterinária em 2002, na Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus Jataí. Em 2004 realizou o primeiro estágio extracurricular na área de Patologia Animal, conduzido no Laboratório de Patologia Veterinária da Escola de Veterinária da UFG (EV/UFG) em Goiânia/GO. Concluiu a graduação em 2006 e após aprovação em concurso público foi efetivado como professor auxiliar nas disciplinas de Patologia Geral e Patologia Veterinária no Campus Jataí da UFG, onde permaneceu no referido cargo durante os anos de 2007 e 2008. Durante três anos (2007 a 2009) foi responsável técnico junto ao Laboratório de Patologia Veterinária da UFG – Campus Jataí. Em 2008 foi aprovado em concurso público para o cargo de Técnico de laboratório em Anatomia Animal, permanecendo até o ano de 2011. Foi admitido como aluno regular no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina no ano de 2013. Em 2015 se tornou docente no Centro Universitário Dinâmica das Cataratas (UDC), responsável pela disciplina de Patologia Veterinária durante o período de março a outubro do presente ano, quando foi aprovado em concurso público para o cargo de Técnico de laboratório em Anatomia Patológica e Citopatológica junto ao curso de Medicina da UFG – Campus Jataí.

Dedicado a Gabriel M. Garcia,
genes dos meus genes,
bênção de Deus na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à espiritualidade superior que zelam pela minha plena integridade e me impulsionam em continuidade à minha missão.

Agradeço aos meus pais, minhas referências de amor, dedicação, responsabilidade, respeito e foco. Em especial ainda agradeço ao meu filho, Gabriel, a luz maior que Deus me concedeu nessa vida, pela saudade e sacrifício de permanecer distante no período necessário ao cumprimento dessa jornada.

À minha noiva Michelly Cristina Silva, agradeço pela cumplicidade, amizade, companhia e conduta companheira, fortalecendo-me dia após dia.

Agradeço à minha orientadora Prof.^a. Aline de Marco Viott. Minha gratidão pela orientação científica, pela competência profissional exemplar, pelas conversas fraternas, pela compreensão e dedicação ao meu favor durante minha “vida palotinese”. Ao prof. Geraldo Alberton pela visão crítica diante dos conhecimentos científicos e incremento profissional à minha bagagem. Aos demais professores do Setor Palotina que auxiliaram no apoio burocrático, técnico e estrutural, Elisabete Takiuchi e Américo F. Garcez Neto. Especialmente, agradeço ao prof. Roberto Guedes pela gentil recepção para meu treinamento no Laboratório de Patologia Veterinária – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sem o qual a presente pesquisa não teria sido possível.

Aos colegas e técnicos do laboratório, agradeço pelo auxílio nos procedimentos laboratoriais, pelas “prosas sem futuro”, conversas extrovertidas, pelas risadas em meio à pressa dos afazeres e pelas caronas. Tatiane Caleffo, Alcides Branco Júnior, Filipe K. Cestari, Jéssica Wammes, Janaína Oberts, João Cavasin, Fernando Giraldez, Rodrigo Barcelos e Anorita Vendrame, muito agradecido!

Agradeço aos médicos veterinários e técnicos que colaboraram sobremaneira na obtenção do material de pesquisa.

À Universidade Federal do Paraná – UFPR e ao Setor Palotina, pelo acolhimento durante o curso, agradecido. Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

As bactérias do gênero *Brachyspira* estão entre as principais causas de diarreia em suínos de recria e terminação. Apesar da sua relevância são raros os estudos de frequência e prevalência desses agentes no rebanho nacional. Este estudo tem por objetivo avaliar a frequência de *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* por meio da técnica do isolamento bacteriano e da reação em cadeia da polimerase (PCR) de cepas cultivadas de amostras de fezes oriundas de rebanhos comerciais de suínos da mesorregião Oeste do estado do Paraná. Foram coletadas fezes em 15 granjas de terminação, com histórico de diarreia, em três municípios distintos. Foram coletados 15 animais por granja totalizando 225 amostras. O cultivo bacteriano objetivando o isolamento microbiológico de bactérias do gênero *Brachyspira* sp. resultou positivo em 97,7% (n=225) das amostras. Foram selecionadas 100 amostras positivas no cultivo bacteriano para a PCR *duplex* para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* que resultou em 39% (n=100) amostras positivas, sendo 61,5% (n=39) positivas para *B. hyodysenteriae*, 28,2% (n=39) para *B. pilosicoli* e 10,3% (n=39) amostras foram positivas para ambos os agentes. Observou-se que 61% (n=100) amostras foram negativas na PCR. Foram realizadas avaliações necroscópicas e histopatológicas de três animais, que revelaram lesões compatíveis com *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*. O diagnóstico das infecções foi firmado com base nas observações epidemiológica e clínica, lesões macroscópicas e histopatológicas, cultivo bacteriano e PCR *duplex*. A associação cultivo bacteriano e PCR *duplex* demonstrou ser eficiente na identificação de *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*. O isolamento bacteriano evidenciou que existe um grande número de bactérias do gênero *Brachyspira* sp. na microbiota intestinal dos suínos estudados. A frequência de *B. hyodysenteriae* foi de 24% (n=100), de *B. pilosicoli* foi 11% (n=100) e 4% (n=100) com detecção de ambas bactérias em suínos comerciais da mesorregião Oeste do estado do Paraná.

Palavras-chave: colite espiroquetar, disenteria suína, isolamento bacteriano, PCR, frequência

ABSTRACT

Brachyspira sp. genus bacteria are among the main causes of diarrhea in growing and finishing pigs. Despite its relevance, the frequency and prevalence studies are uncommon in the Brazilian herd. This study aims to assess the frequency of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* by bacterial isolation and polymerase chain reaction (PCR) of faeces stool obtained from commercial swine farms in the western region of Paraná state. Stool from 15 finishing farms, with diarrhea history, were collected of three distinct municipalities. Were collected 15 animals per farm totaling 225 samples. The bacterial culture aiming microbiologic isolation of bacteria of the genus *Brachyspira* sp. were positive in 97.7% (n=225) of the samples. Of the amount of positive bacterial culture, 100 samples were selected for duplex PCR aiming *B. hyodysenteriae* and *B. pilosicoli*, resulting in 39% (n=100) positive samples. Of these 61.5% (n=39) were positive for *B. hyodysenteriae*, 28.2% (n=39) positive for *B. pilosicoli*, and 10.3% (n=39) samples were positive for both agents. It was observed that 61% (n=100) samples were negative in the PCR. Necropsy and histological results of three animals were held, which identified lesions compatible with *B. hyodysenteriae* and *B. pilosicoli*. The diagnosis of infections were signed based on epidemiological and clinical observations, gross and histopathological lesions, bacterial culture and duplex PCR. The bacterial culture in association with duplex PCR proved to be efficient in identifying *B. hyodysenteriae* and *B. pilosicoli*. The bacterial culture revealed that there is a large number of bacteria of the genus *Brachyspira* sp. present in the intestinal tract of studied swines. The frequency of *B. hyodysenteriae* was 24% (n=100), of *B. pilosicoli* was 11% (n=100) and 4% (n=100) indicated the presence of both agents in the western region of Paraná state.

Key words: *spirochaetal colitis, swine dysentery, bacterial isolation, PCR, frequency*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Característica do isolamento bacteriano para *Brachyspira* spp. das amostras de fezes de suínos de terminação coletadas na mesorregião Oeste do estado do Paraná.....30

Tabela 2 – Resultado da PCR *duplex* para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* em amostras positivas no isolamento bacteriano para *Brachyspira* spp.32

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Distribuição percentual de acordo com os municípios onde foram coletadas as amostras de fezes de suínos em terminação na mesorregião Oeste do estado do Paraná.....29
- Figura 2 – Placas de ágar sangue, áreas de forte hemólise (A) e fraca hemólise (B) nos locais de crescimento bacteriano. (C) Evidenciação de bactérias morfológicamente compatíveis com o gênero *Brachyspira* (obj. 60x).31
- Figura 3 – Resultado PCR *duplex* Gel de agarose mostrando o tamanho dos produtos de PCR de algumas amostras coletadas a campo, *Brachyspira pilosicoli* 823 pb (BP); *Brachyspira hyodysenteriae* 354 pb (BH); Kb, marcador de peso molecular e C-, controle negativo. Linhas 1, 2 e 10 detecções de *Brachyspira pilosicoli*, linhas 3, 4 e 9 detecções de *Brachyspira hyodysenteriae*, linhas 5, 6, 11 e 12 amostras negativas e linhas 7 e 8 detecções mista por *Brachyspira pilosicoli* e *Brachyspira hyodysenteriae*.33
- Figura 4 – Colite espiroquetar e disenteria suína no Paraná. (A) Edema de mesocólon espiral. (B). Colite fibrino necrótica acentuada. (C) Conteúdo intestinal fluido e hemorrágico. (D) Conteúdo intestinal fluido e mucoso.....34
- Figura 5 – Suínos de terminação infectados por *Brachyspira hyodysenteriae* no estado do Paraná. (A) Colite erosiva difusa moderada caracterizada pela necrose e desprendimento do epitélio superficial da mucosa (setas) HE, obj. 10x. (B) Na mucosa (Mu), nota-se infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário difuso acentuado distendendo a lâmina própria e hiperemia difusa moderada; infiltrado inflamatório semelhante também pode ser observado na submucosa (Sm) HE, obj. 10x. (C) Cólon, hiperplasia de MALT difusa acentuada (estrelas) HE, obj. 10x. (D) Erosão e úlcera focal (asterisco) com liberação de grande quantidade de debris celulares para a luz intestinal (setas) HE, obj. 10x. (E) Criptas intestinais, dilatação difusa moderada com restos celulares na luz (setas) e necrose individual de enterócitos (detalhe) HE obj. 20x. (F) Hiperplasia de células caliciformes difusa acentuada HE obj. 20x.35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 HISTÓRICO	13
2.2 COLITE ESPIROQUETAL	14
2.3 DISENTERIA SUÍNA.....	16
2.4 EPIDEMIOLOGIA E PREVALÊNCIA	19
2.5 OUTRAS BRACHYSPIRAS PATOGÊNICAS	21
2.6 DIAGNÓSTICO	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO	25
3.2 AMOSTRAS.....	25
3.3 ISOLAMENTO BACTERIANO	26
3.4 PCR <i>DUPLEX</i> PARA <i>B. hyodysenteriae</i> E <i>B. pilosicoli</i>	27
3.5 HISTOPATOLOGIA	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	29
4.2 ISOLAMENTO BACTERIANO	30
4.3 PCR <i>DUPLEX</i>	31
4.4 ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS	33
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da suinocultura brasileira e mundial se sustenta no aperfeiçoamento de tecnologias e conhecimentos sobre genética, nutrição, manejo, bem-estar e sobretudo sanidade animal. As enfermidades infecciosas bacterianas intestinais em suínos são condições importantes e frequentemente observadas em animais de diferentes faixas etárias. *Brachyspira pilosicoli* e *Brachyspira hyodysenteriae*, agentes causadores primários da colite espiroquetel e disenteria suína respectivamente, estão entre as principais bactérias causadoras de enterites em suínos na fase final de produção (HAMPSON E TROTT, 2006). As bactérias do gênero *Brachyspira* sp. são responsabilizadas pelo aumento no número de casos clínicos dessas enfermidades nos Estados Unidos e Canadá desde 2007 (CHANDER et al., 2012).

No Brasil, a disenteria suína já foi relatada em alguns estados, como Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo (INSTITUTO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS DESIDÉRIO FINAMOR, 1978; MORÉS & SOBESTIANSKY¹, 1984 citado por BARCELLOS et al. 2010; WARTH² et al., 1985 citado por BARCELLOS et al. 2010; BARCELLOS et al., 1995; BACCARO et al., 1999). Entre os anos de 2008 e 2009, um estudo de prevalência de enteropatógenos em suínos de recria e terminação de 46 rebanhos do estado de Minas Gerais revelou apenas dois rebanhos positivos para *B. pilosicoli* e nenhum caso positivo para *B. hyodysenteriae* (VIOTT et al., 2013).

Entretanto, de 2010 até 2014, foram detectados dezoito novos surtos de disenteria suína (DANIEL, 2014), criando um cenário nacional alarmante, onde até então existiam relatos esporádicos de baixo impacto econômico. Desde então, grandes e relevantes regiões produtoras de suínos do país, inclusive o estado do Paraná, possuem casos confirmados dessas enfermidades (DANIEL, 2013; DANIEL,

¹ MORÉS, N. & SOBESTIANSKY, J. **Controle da disenteria suína através da quimioterapia e limpeza e desinfecção das instalações.** In: Anais do I Congresso Brasileiro dos Veterinários Especialistas em Suínos, Curitiba, Brasil, 28, 1984.

² WARTH, J. F. G., KLUPPEL, M. E. A. & DITTRICH, T. R. C. **Diagnóstico da disenteria suína no Estado do Paraná.** In: Anais II Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Rio de Janeiro, 109, 1985.

2014). As perdas econômicas devido à elevação do custo de produção, incluindo despesas com tratamentos, aumento da conversão alimentar, desuniformidade entre lotes e aumento da taxa de mortalidade no rebanho são consequências da diarreia característica do curso clínico das espiroquetoses intestinais em suínos (BACCARO et al., 2003; JACOBSON et al., 2005).

Embora as espiroquetas do gênero *Brachyspira* estejam presentes nos rebanhos suínos do Brasil há muito tempo, a relevância das enfermidades por elas causadas é recente e pouco estudada. Trabalhos sobre a frequência são raros e até o momento nenhum foi realizado no estado do Paraná. Diante disso, este estudo se propõe a avaliar a frequência da infecção por *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae* por meio da técnica do isolamento bacteriano e da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a tipificação das cepas cultivadas de amostras oriundas de rebanhos comerciais de suínos do município de Palotina e região.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As bactérias do gênero *Brachyspira* estão entre as principais causas de diarreia em suínos de recria e terminação. Há décadas as espécies *Brachyspira pilosicoli* e *Brachyspira hyodysenteriae* são reconhecidamente patogênicas para suínos (TAYLOR E ALEXANDER, 1971; TAYLOR et al., 1980). Outras espécies importantes são encontradas no trato gastrointestinal de animais e seres humanos, causando alterações patológicas ou não, tais como *B. intermedia*, *B. murdochii*, *B. innocens*, *B. alvinipulli* e *B. aalborgi* (STANTON et al., 1997; FELLSTRÖM et al., 2001a; JENSEN et al. 2001; FEBERWEE et al., 2008; DUHAMEL, 2011). Exceto as duas últimas, todas as demais espécies supracitadas são encontradas no intestino de suínos, (STANTON, 2006; RÅSBÄCK et al., 2007).

2.1 HISTÓRICO

A espiroquetose intestinal suína associada a diarreia foi relatada primeiramente por Whiting et al.³ (1921 citado por HAMPSON E TROTT, 1995). E durante 50 anos, até o final da década de 70, todas as espiroquetas intestinais beta hemolíticas presentes no intestino dos suínos eram consideradas não patogênicas. Outros estudos avaliando cursos clínicos e alterações patológicas específicas (TAYLOR E ALEXANDER, 1971; HARRIS et al., 1972) descreveram uma espiroqueta anaeróbica patogênica sendo a causadora da disenteria suína, denominada *Treponema hyodysenteriae*. Trabalhos contemporâneos (TAYLOR, 1972; HUDSON et al., 1976) descreveram espiroquetas fracamente hemolíticas em ágar sangue oriundas do intestino grosso de suínos doentes e sadios. Posteriormente, Taylor et al. (1980) sugeriram que algumas espiroquetas intestinais beta hemolíticas poderiam estar associadas com diarreias não fatais em suínos na fase de crescimento. A mais importante delas futuramente seria denominada *Serpulina pilosicoli* (TAYLOR et al., 1980; TROTT et al., 1996).

³ WHITING, R. A., DOYLE, L. P., SPRAY, R. S. **Swine dysentery**. Purdue Univ. Agric. Exp. Stn. Bul., 1, 257, p. 3-15, 1921.

Na década de 1990, Duhamel et al. (1996) determinaram que as espiroquetas intestinais beta hemolíticas associadas com uma forma de infecção intestinal em suínos, denominada colite espiroquetar, eram diferentes das outras espécies do gênero, mas apresentavam algumas características fenotípicas em comum com espécies apatogênicas, chamadas *Serpulina innocens* e *S. murdochii*. Os autores supracitados propuseram o nome *Serpulina pilosicoli* para descrever a espiroqueta fracamente beta hemolítica patogênica. Por fim, avanços tecnológicos em pesquisas moleculares usando o sequenciamento do RNA ribossomal 16S geraram informações mais detalhadas e precisas quanto à caracterização filogenética das espiroquetas em estudo. As espiroquetas de interesse clínico e patológico foram reclassificadas e agrupadas no gênero *Serpulina* (STANTON, 1992) e Ochiai et al., em 1997, propuseram a nomenclatura e classificação atual, gênero *Brachyspira*.

2.2 COLITE ESPIROQUETAL

A colite espiroquetar é uma enfermidade de distribuição mundial que afeta o intestino grosso de suínos acima 60-65 dias de idade, causada pela *Brachyspira pilosicoli*, uma espiroqueta Gram negativa, flagelada, anaeróbia e que produz fraca hemólise em ágar sangue (GUEDES, 2005). O sinal clínico característico é a diarreia mucóide autolimitante, com fezes em aspecto de “cimento fresco” (DUHAMEL et al., 1996). A mortalidade é incomum e os prejuízos da infecção resultam da redução no ganho de peso diário e piora na conversão alimentar (GIRARD et al., 1995; THOMSON et al., 1998).

Associada a enfermidades do intestino grosso em humanos, macacos, aves domésticas e selvagens, ratos, cães e suínos, a *B. pilosicoli* é reconhecida como um agente zoonótico (BOYE et al., 2001). A infecção em humanos tem sido descrita em países africanos e entre aborígenes australianos (LEE et al., 1993a; TROTT et al., 1997). Nos países ocidentais, a espiroquetose intestinal clínica se restringe a grupos de indivíduos imunodeprimidos e homossexuais (TROTT et al., 1995). Em suínos, a infecção ocorre geralmente por ingestão de matéria fecal e acomete os animais na fase imediatamente posterior à transferência entre creche e recria (GUEDES E

BARCELLOS, 2012a). A maior susceptibilidade nesse período pode ser explicada pelas novas condições de manejo e estresse em que os suínos são expostos, tais como movimentação, mistura de animais, mudanças de ração e alojamento em ambiente mais contaminado.

A capacidade de se aderir às células epiteliais do intestino grosso confere à *B. pilosicoli* o seu maior efeito patogênico, sendo que a colonização pela massa bacteriana é capaz de reduzir a eficiência da absorção e causar diarreia mucóide (DUHAMEL et al., 1996; BARCELLOS, 2000). Ensaio *in vitro* reforçam a quimiotaxia existente entre as espiroquetas de *B. pilosicoli* e a mucina presente no muco que reveste o epitélio intestinal (NARESH E HAMPSON, 2010). Estudos comparativos com células cultivadas e modelos animais sugerem que a aderência com as células epiteliais envolve a relação entre moléculas específicas nas espiroquetas (adesinas) e receptores na célula do hospedeiro (MUNIAPPA et al., 1996; DUHAMEL et al., 2006). Outro mecanismo de patogenicidade descrito é a capacidade de ligação da bactéria com o receptor glicose-galactose do enterócito. Esta proteína bacteriana é codificada pelo gene *mglB* que determina a síntese de um produto de expressão que influencia diretamente na capacidade da *B. pilosicoli* em causar infecção intestinal (ZHANG et al., 1998).

As lesões macroscópicas específicas da infecção pela *B. pilosicoli* são restritas ao intestino grosso, que geralmente está flácido e com a parede espessada, em casos iniciais, com edema no mesentério. O conteúdo intestinal é fluido, mas pode se tornar mais denso próximo ao reto (TAYLOR E TROTT, 1997). Ocasionalmente, os danos à mucosa se caracterizam por erosões focais coalescentes, com aderência de partículas de alimento e placas de material necrótico, conferindo um aspecto de “calçamento com paralelepípedos” (TAYLOR et al., 1980; JOHNSTON et al., 1999). Na progressão do curso clínico, frequentemente se observa mucosa congesta com áreas multifocais de hemorragia e aumento da produção de muco (DUHAMEL, 2001).

O achado histológico mais marcante e importante da colite espiroquetar é a colonização da superfície epitelial do ceco e do cólon por um grande número de espiroquetas, formando uma figura definida como “falsa borda em escova”. A tiflocolite catarral erosiva ou ulcerativa multifocal, característica da doença, está associada à necrose e descamação do epitélio intestinal, edema de mucosa com

moderada inflamação e distensão da lâmina própria, com formação de debris celulares e exsudato fibrinoso contendo numerosas espiroquetas, frequentemente observados aderidos ao epitélio lesionado (TAYLOR E TROTT, 1997). As espiroquetas também podem ser encontradas dentro das criptas, assim como entre as células epiteliais descamadas e em multiplicação ativa dentro de macrófagos (SOBESTIANSKY E BARCELLOS, 2001).

2.3 DISENTERIA SUÍNA

A disenteria suína é uma enfermidade infectocontagiosa de distribuição mundial que acomete principalmente animais na fase de recria e terminação, causada pela *B. hyodysenteriae*, uma bactéria Gram negativa, móvel, espiralada e anaeróbia (HAMPSON et al., 1997). Suínos de recria e terminação são mais susceptíveis à doença, embora a infecção possa ocorrer em animais de todas as idades (HAMPSON et al., 2006).

A infecção ocorre por ingestão de fezes contaminadas. O patógeno é introduzido no rebanho pelo contato com animais clinicamente sadios infectados, recentemente inseridos na propriedade ou por aqueles que se recuperaram da doença e permanecem eliminando o microrganismo após o término dos sinais clínicos. A doença clínica geralmente é observada após 10 a 14 dias em suínos naturalmente infectados, período de incubação que pode ser variável de acordo com a condição imunológica do animal, virulência da cepa e pressão de infecção (HAMPSON et al., 2006).

O sinal clínico característico é a diarreia muco-hemorrágica ou mucosa com sangue, por vezes com fibrina, associado a anorexia, emaciação e morte em poucos dias após o início dos sinais clínicos em animais não tratados (HAMPSON et al., 1997; GUEDES, 2005). Na forma aguda a *B. hyodysenteriae* causa colite severa cursando com diarreia hemorrágica e que pode matar o animal em até 24 horas caso não seja tratada. O curso clínico está associado a anorexia, sede intensa, flancos abdominais retraídos, emagrecimento rápido e febre, com a temperatura corporal podendo atingir 40 °C. Na apresentação crônica, a *B. hyodysenteriae* causa

diarreia não sanguinolenta, apatia e diminuição do ganho de peso diário originando animais “refugos” e perda da uniformidade no rebanho. A forma super aguda da enfermidade, em que os animais morrem em poucas horas sem ocorrer diarreia, é rara (SOBESTIANSKY, 1999).

Além dos fatores individuais, animal infectado e cepa bacteriana envolvida, condições inerentes a instalações, ambiente e manejo podem ser determinantes na gravidade da disenteria suína em um rebanho. Excesso de umidade, mistura de animais, superpopulação de baias, mudanças de rações, temperaturas baixas, presença de reservatórios, vetores biológicos e mecânicos, como cães (FELLSTROM et al., 2001a; OXBERRY E HAMPSON, 2003), ratos (HAMPSON et al., 1991), moscas e aves (JANSSON et al., 2001; JANSSON et al., 2004; JANSSON et al., 2009) são alguns dos principais exemplos de fatores extrínsecos que podem elevar os prejuízos causados por essa enfermidade. A transmissão mecânica também ocorre por meio de caminhões e rações contaminados ou pela movimentação de pessoas com roupas e calçados contaminados (HAMPSON E TROTT, 2006).

Duas condições especiais que podem influenciar no desenvolvimento da doença clínica causada pela *B. hyodysenteriae*, uma individual e outra nutricional, são relatadas de modo relevante por alguns pesquisadores. Individualmente, a presença de determinadas espécies de microrganismos na composição da microbiota residente no intestino grosso favorece a colonização pela *B. hyodysenteriae* por meio de sinergismo microbiológico (WHIPP et al., 1979; JONES et al., 1981). Além dessas variáveis, o componente nutricional pode influenciar diretamente no desenvolvimento da enfermidade clínica. A dieta fornecida cria condições intestinais que ora colaboram para a colonização, ora protegem a mucosa contra a proliferação das espiroquetas patogênicas (SIBA et al., 1996).

Nabuurs (1986) e Dewey (1993) relataram que dietas a base de soja predispõe os animais ao desenvolvimento de diarreia. Dréau et al. (1994) atribuíram este desequilíbrio intestinal a determinadas proteínas presentes na soja, capazes de provocar reações imunológicas no intestino delgado e presença de fatores antinutricionais indutores de diarreia, tais como fitatos, lectinas e inibidores de tripsina. A alteração do equilíbrio da microbiota residente no intestino grosso já foi igualmente atribuída ao uso de dietas contendo 40% de soja, gerando condição

predisponente ao desenvolvimento de diarreia clínica (NEEF et al., 1994a). Siba et al., (1996) ainda propuseram que a ingestão de polissacarídeos não amiláceos colaboram com a fermentação microbiológica e produção de ácidos graxos voláteis no intestino grosso que por sua vez favoreceria a condição disentérica.

Em contraste, dietas a base de proteína animal e arroz cozido conferem efeito protetor à mucosa intestinal contra a colonização da *B. hyodysenteriae* (SIBA et al., 1996; DURMIC et al., 1998). A redução do pH no intestino grosso foi relatada como o mecanismo inibidor da proliferação de *B. hyodysenteriae* no fornecimento de dietas a base de silagem de milho (PROHÁSZKA E LUKÁCS, 1984). Em suma, Neef et al. (1994b) relataram a influência da dieta sobre a microbiota e favorecimento à colonização de espiroquetas intestinais em suínos com microbiota intestinal livre desses microrganismos, mas também reportaram que isoladamente a colonização não determina a disenteria clínica, atribuindo maior relevância à patogenicidade da cepa envolvida.

A patogênese associada à disenteria suína é complexa e não está plenamente esclarecida, havendo vários fatores e mecanismos fisiopatogênicos envolvidos. A *B. hyodysenteriae* ingerida é protegida da acidez estomacal pelo muco das fezes diarreicas, e alcançando o intestino grosso invade as criptas da mucosa, nas quais se multiplica. Apesar do agente ser visto, ocasionalmente, dentro dos enterócitos e na lâmina própria das áreas afetadas, acredita-se que as lesões sejam produzidas pela ação da hemolisina liberada durante a sua multiplicação e por lipooligossacarídeos de superfície (GUEDES E BARCELLOS, 2012b). As proteínas de membrana externa da *B. hyodysenteriae* incluem as proteínas variáveis de superfície (Vsp) e lipoproteínas como a SmpA e a BmpB que parecem estar envolvidas na evasão do sistema imune (TROTT et al., 2001). A diarreia observada ocorre devido à interferência na absorção de água e eletrólitos, com disfunção dos canais transportadores de íons sódio e cloreto, associado a estímulos de hipersecreção de muco (ARGENZIO et al., 1980; LIEBLER-TENORIO et al., 2006). Adicionalmente, a lesão esfoliativa e erosiva sobre o epitélio intestinal provoca hiperplasia de células caliciformes, elevando ainda mais a produção de muco (KINYON et al., 1980; KENNEDY et al., 1988).

As lesões macroscópicas características da disenteria suína se restringem ao intestino grosso, com área linear de demarcação quase sempre evidente na

junção ileocecal. A alteração macroscópica básica é uma enterite muco-hemorrágica ou fibrino-hemorrágica, dependendo da evolução da enfermidade. Em casos agudos, na mucosa há hiperemia e edema acentuados, conteúdo intestinal fluido ocasionalmente com sangue, edema de mesocólon e linfonodos mesentéricos aumentados de volume. As lesões macroscópicas crônicas são caracterizadas por deposição de membranas fibrino necróticas sobre a mucosa com hiperemia e edema em intensidades variáveis, podendo observar linfadenomegalia mesentérica (HAMPSON et al., 2006).

As lesões histopatológicas significativas são unicamente observadas no ceco, cólon (GUEDES E BARCELLOS, 2012b). As lesões agudas típicas incluem espessamento da mucosa e da submucosa devido à hiperemia e ao extravasamento de fluidos e leucócitos para a lâmina própria. Há hiperplasia das células caliciformes e das células epiteliais na base das criptas que podem se apresentar dilatadas. As espiroquetas podem ser observadas no interior das células caliciformes, entre e no interior dos enterócitos. Há necrose e desprendimento do epitélio e infiltrado inflamatório neutrofílico acentuado na lâmina própria, principalmente nas áreas perivasculares próximas ao lúmen intestinal. Nas lesões crônicas nota-se o acúmulo de grandes quantidades de fibrina, muco e restos celulares sobre a mucosa intestinal e interior das criptas. A necrose do epitélio superficial é frequente e pode ser acentuada, mas ulcerações profundas são raras (FELLSTRÖM et al., 1996; SOBESTIANSKY E BARCELLOS, 2001).

2.4 EPIDEMIOLOGIA E PREVALÊNCIA

B. hyodysenteriae possui distribuição mundial, ocorrendo principalmente nas regiões com maior densidade de unidades produtoras de suínos (MUNIAPPA et al., 1997; BOYE et al., 1998; THOMSON et al., 1998; CALDERARO et al., 2001). Suínos de todas as idades são susceptíveis à doença, no entanto é mais comum em animais de recria e terminação (HAMPSON et al., 2006). Nos casos de disenteria suína, a morbidade pode chegar a 37% e a mortalidade pode atingir 30% em animais não tratados (HAMPSON et al., 2006; STANTON, 2006). A introdução do agente no rebanho frequentemente ocorre pelo contato com animais subclínicos

introduzidos ao plantel ou por aqueles que se recuperaram da doença e permanecem excretando após o término dos sinais clínicos (HAMPSON & TROTT, 2006). Reproduzindo três distintos microambientes *in vitro*, Boye et al. (2001) recuperaram cepas de *B. hyodysenteriae* viáveis em cultivo por até 112 dias. Uma vez no ambiente, as *Brachyspira* spp. se tornam importante fonte de contaminação e recontaminação dentro do sistema de produção.

Na Europa, desde o início da década de 1990, estudos revelam a prevalência crescente das enteropatias causadas por *Brachyspira hyodysenteriae*. Na Grã-Bretanha, Thomson et al. (1998) detectaram a *B. hyodysenteriae* como agente causador de diarreia em 7% das propriedades. Em estudo conduzido pela mesma equipe de pesquisa alguns anos depois, este agente foi detectado em 13% das propriedades com colite clínica (THOMSON et al., 2001). Dados de prevalência semelhantes na Dinamarca, com detecção de *B. hyodysenteriae* em 14% dos casos de diarreia estudados em suínos e na Suécia, onde foi revelado outros 14% de infecção por *B. hyodysenteriae* em 72 granjas (MOLLER et al., 1998). Elevados índices de prevalência são reportados na Polônia (PLAWINSKA et al., 2004) e Espanha (CARVAJAL et al., 2003), alcançando respectivamente os valores de 38,8% e 45,4%. Na América do Norte, embora a disenteria suína não tenha sido diagnosticada nos rebanhos suínos nos últimos 20 anos, diversos casos desta enfermidade têm sido reportados nos Estados Unidos e Canadá desde 2008 (CHANDER et al., 2012). No laboratório de diagnóstico veterinário em Iowa State University foi verificado aumento de 3 isolados em 15 casos testados em 2005, para 466 isolados em 3.465 casos em 2010 (CLOTHIER et al., 2011).

No Brasil, a disenteria suína foi relatada nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul nas décadas de 1980 e 1990 (MORÉS & SOBESTIANSKY⁴, 1984 citado por BARCELLOS et al., 2010; WARTH⁵, 1985 citado por BARCELLOS et al., 2010; BARCELLOS et al., 1995; BACCARO et al., 1999). Os relatos eram esporádicos, de pouca importância epidemiológica ou resultantes

⁴ MORÉS, N. & SOBESTIANSKY, J. **Controle da disenteria suína através da quimioterapia e limpeza e desinfecção das instalações.** In: Anais do I Congresso Brasileiro dos Veterinários Especialistas em Suínos, Curitiba, Brasil, 28, 1984.

⁵ WARTH, J. F. G., KLUPPEL, M. E. A. & DITTRICH, T. R. C. **Diagnóstico da disenteria suína no Estado do Paraná.** In: Anais II Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Rio de Janeiro, 109, 1985.

dos procedimentos de padronização das técnicas diagnósticas (BARCELLOS et al., 2010).

No estado do Rio Grande do Sul, Barcellos et al. (2000) avaliaram a presença de *Brachyspiras* spp. patogênicas em granjas com baixa tecnificação e histórico de diarreia e obtiveram prevalência de 35,3% para *B. hyodysenteriae* e de 41,2% para *B. pilosicoli*. Posteriormente, avaliando a implicação do uso de antimicrobianos sobre a prevalência de *Brachyspira* sp., Barcellos et al. (2003) observaram que a *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* foram detectadas, respectivamente, em 0% e 6,25% das granjas medicadas e em 31,8% e 45,5% das granjas não medicadas, indicando a interferência do uso de antibióticos na ração sobre a presença das espiroquetas. Em estudo sobre a prevalência em animais de terminação no estado de Santa Catarina, foi observado 6% para *B. hyodysenteriae* e 8,8% para a *B. pilosicoli* como agente único (MENIN et al., 2008).

Avaliando a presença de microrganismos causadores de diarreia nas fases finais de produção, Baccaro et al. (2003) conduziram estudo abrangendo diferentes regiões produtoras de suínos no Brasil e encontraram 1,4% amostras positivas para *B. hyodysenteriae* e 1% para *B. pilosicoli*, como agentes únicos. Entre os anos de 2008 e 2009, foi realizado um estudo de prevalência de enteropatógenos em suínos de recria e terminação em 46 rebanhos no estado de Minas Gerais. Neste estudo não foi detectado nenhuma granja positiva para *B. hyodysenteriae* e apenas dois rebanhos positivos para *B. pilosicoli* (VIOTT, 2010; VIOTT et al., 2013).

Apesar de pouco relatada em anos anteriores, entre 2010 e 2014 foram identificados pelo Laboratório de Patologia Animal da UFMG dezoito novos surtos de disenteria suína, abrangendo os estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (DANIEL et al., 2014).

2.5 OUTRAS BRACHYSPIRAS PATOGÊNICAS

O ressurgimento das enfermidades causadas por espiroquetas e os resultados negativos na identificação da *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* tem suscitado numerosas pesquisas e revelação de espécies até então desconhecidas,

recentemente classificadas num grupo denominado “Novel Strong Hemolytic” *Brachyspira* (*NSH-Brachyspira*) (GEBHART E PRIMUS, 2011).

Por meio de novos avanços em técnicas moleculares, diferenciações filogenéticas da *B. hyodysenteriae* já se tornaram possíveis e novas terminologias têm surgido e se atribuído ao que se acreditava ser duas espécies até então desconhecidas: “*Brachyspira suanatina*”, “*Brachyspira* sp. SASK30446” e “*Brachyspira intermedia* atípica” (RÅSBÄCK et al., 2007; BURROUGH et al., 2012). Essas duas últimas, no entanto, por meio do sequenciamento de DNA do gene *nox* e novas análises filogenéticas foram classificadas numa única espécie denominada “*Brachyspira hampsonii*”. Cepas antes denominadas “*Brachyspira intermedia* atípica” foram classificadas em “*Brachyspira hampsonii* subtipo I” e “*Brachyspira* sp. SASK30446” em *Brachyspira hampsonii* subtipo II (CHANDER et al., 2012; VANUCCI E GEBHART, 2013).

2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico presuntivo das espiroquetoses intestinais pode ser feito por microscopia de esfregaço das fezes (VIOTT, 2010). No entanto, para um diagnóstico efetivo é necessário reunir dados clínicos, lesões macroscópicas e histopatológicas, e exames laboratoriais específicos, como o isolamento bacteriano e ensaios moleculares.

O isolamento é reconhecido como a técnica “padrão ouro” para o diagnóstico laboratorial das espiroquetoses intestinais em suínos (FELLSTRÖM et al., 2001a; STANTON, 2006), capaz de detectar pequenas quantidades de bactérias nas fezes (BARCELLOS, 2000; KOMAREK et al., 2009). FELLSTRÖM et al. (2001a) demonstraram ser o isolamento bacteriano um teste altamente sensível, sendo efetivo mesmo na presença de apenas uma espiroqueta, em condições de conservação ideais. O isolamento bacteriano além de ser uma técnica de diagnóstico confiável, permite a posterior avaliação das cepas isoladas quanto às concentrações inibitórias mínimas (MIC), teste que mensura a sensibilidade bacteriana aos antimicrobianos (VANUCCI E GEBHART, 2013).

Outros métodos diagnósticos que podem ser realizados aproveitando o cultivo e isolamento prévio das espiroquetas são as análises fenotípicas. Provas bioquímicas e avaliações do grau de hemólise em ágar sangue permitem a identificação de espécies do gênero *Brachyspira*. Provas do indol e hidrólise do hipurato são dois testes bioquímicos frequentemente realizados, nos quais se analisa a produção e detecção de metabólitos bacterianos específicos (FELLSTRÖM E GUNNARSSON, 1995; FELLSTRÖM et al., 1997).

Mesmo sendo uma técnica de diagnóstico altamente sensível e efetiva, o isolamento bacteriano pode gerar resultados equivocados. Uma vez que as bactérias precisam estar viáveis para o cultivo, o tempo gasto da coleta até a chegada no laboratório e condição térmica de transporte da amostra para análise podem comprometer os resultados (NEVES, 2012). Além disso, infecções intestinais com envolvimento de mais de um patógeno são possíveis (GUEDES, 2010), exigindo o desenvolvimento e aplicação de novas técnicas de diagnóstico e aperfeiçoamento das já existentes.

Técnicas que visam a análise do ácido nucléico (DNA) já são amplamente utilizadas no diagnóstico das infecções por bactérias do gênero *Brachyspira*, principalmente por serem rápidas e de fácil execução (GUEDES E BARCELLOS, 2012). Ensaios de PCR foram desenvolvidos para detecção individual, dupla ou múltipla de patógenos associados às principais enfermidades entéricas bacterianas (ATYEO et al., 1998; LA et al., 2003; LA et al., 2006). A amplificação de segmentos dos genes ribossomais 16S ou 23S (16S rRNA e 23S rRNA) ou do gene codificador da NAD oxidase vem sendo largamente utilizada no diagnóstico da colite espiroquetar (ELDER et al., 1994; LA et al., 2006; PHILLIPS et al., 2009). Apesar de suas vantagens notáveis, as técnicas de diagnóstico pela PCR ainda são onerosas e apresentam baixa sensibilidade, o que pode resultar em amostras falso-negativas (KOMAREK et al., 2009).

Uma técnica molecular complementar que tem sido eficientemente utilizada em pesquisas é a hibridização fluorescente *in situ* (FISH - *Fluorescent in situ hybridization*). Já reconhecida como alternativa efetiva para detecção específica e definitiva de agentes infecciosos em cortes histológicos, a FISH é capaz de gerar informações sobre a distribuição espacial do patógeno no tecido e sua associação com a lesão (BOYE et al., 1998). Sondas específicas conjugadas com substâncias

fluorescentes são utilizadas para identificação de diferentes espécies de bactérias do gênero *Brachyspira* (JENSEN et al, 1998 e 2000). Recentemente, Neves (2012) relatou elevados índices de concordância (38,5%) na comparação das técnicas de FISH e PCR convencional na detecção de *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*.

Exames histopatológicos de rotina podem revelar a presença das espiroquetas no tecido intestinal, sendo ainda mais efetivamente evidenciadas quando realizadas colorações pela prata (HARRISSON E GOSSER, 1979). Em caráter complementar, protocolos da técnica de imunohistoquímica (IHQ) foram delineados há vários anos (THOMAS E SELWOOD, 1992; JOENS et al., 1993). Ensaio mais recentes relatam que a IHQ é capaz de detectar o gênero *Brachyspira*, mas não permite a distinção entre espécies patogênicas ou apatogênicas (PAULOVICH et al., 2004; HAMPSON et al., 2006; NEVES, 2012). Apesar de permitirem a visualização espacial do patógeno no tecido e associação do mesmo com a lesão, o exame histopatológico e a IHQ compreendem duas técnicas de valor diagnóstico limitado em se tratando de espiroquetas intestinais em suínos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no período de 2014 a 2015 no Laboratório de Patologia Veterinária, Laboratório de Doenças Infecciosas e no Laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC), do Departamento de Medicina Veterinária (DMV), da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina (UFPR/Setor Palotina).

3.2 AMOSTRAS

Para o experimento foram coletadas fezes de 15 granjas produtoras de suíno, localizadas no município de Palotina e região. As regiões estudadas apresentavam o contraste de área com alta densidade na produção de suínos e diagnósticos clínicos positivos de enteropatias causadas por *Brachyspira* sp. (Nova Santa Rosa) com áreas com menor densidade produtiva sem relatos de casos clínicos das doenças causadas por *Brachyspira* sp. As fezes eram coletadas diretamente do reto de animais na fase de terminação. Para esse procedimento utilizava-se um frasco plástico estéril distinto para cada amostra, coletando fezes de 15 animais por propriedade. Após a coleta, as amostras eram acondicionadas em refrigeração dentro de caixa isotérmica e levadas ao Laboratório de Patologia Veterinária e Doenças Infecciosas para serem processadas. No momento da coleta eram levantadas informações sobre a idade, histórico clínico, presença e aspecto da diarreia e tratamento utilizado.

Todos os rebanhos amostrados eram constituídos por animais com idade entre 72 e 161 dias. Duas granjas alojavam animais mais jovens, entre 70 e 80 dias de idade (G7 e G8) e outras duas continham animais mais velhos, com idade entre 150 e 160 dias (G9 e G12). Histórico de diarreia com sangue estava presente em nove (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G9, G14 e G15) das 15 granjas amostradas e no

momento das coletas haviam poucos animais com doença clínica sugestiva da infecção por *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*. Quando presentes, os sinais clínicos observados se caracterizavam por diarreia mucóide, por vezes hemorrágica, apatia e emaciação.

Todos os rebanhos amostrados pertenciam a granjas de terminação e recebiam ração medicada formulada na fábrica e entregue ao produtor. Como todas as granjas faziam parte de um sistema de integração, o protocolo profilático e terapêutico aplicado era o mesmo. A todas as granjas com problema de diarreia era proposta a utilização de Dysantic^{®6} via ração, utilização ou não que ficava a ser decidida entre o médico veterinário ou técnico e o proprietário. Nas granjas que possuíam animais clinicamente afetados a ração era acrescida de tiamulina 80% na dose de 10 mg/kg durante cinco dias.

3.3 ISOLAMENTO BACTERIANO

As amostras de fezes frescas foram semeadas por meio de alças estéreis descartáveis em placas contendo meio seletivo para *Brachyspira* sp. (5% sangue ovino, 6,25 µg/µl rifampicina⁷, 800 µg/ µl de espectinomicina⁸, 25 µg/ µl de vancomicina⁹, 25 µg/ µl de colistina¹⁰) (adaptado de NOVOTNÁ E SKARDOVÁ, 2002) e incubadas, por no mínimo 72 horas a 42 °C, em jarras de anaerobiose¹¹. Juntamente com as placas das amostras semeadas foi incubado um gerador de atmosfera anaeróbica (Anaerobac^{®6}) e uma fita indicadora de anaerobiose conforme instruções do fabricante. Após a constatação do crescimento de colônias bacterianas compatíveis com *Brachyspira* sp. em placa, em algumas amostras foram feitas avaliações das mesmas sob microscopia de contraste de fase em preparações líquidas em lâminas.

⁶ VETANCO[®] do Brasil, Dysantic[®], Chapecó, SC, Brasil.

⁷ Rifampicin, Sigma-Aldrich[®], cat n° R3501, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

⁸ Spectinomicin, Sigma-Aldrich[®], cat n° S9007, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

⁹ Vancomycin, Sigma-Aldrich[®], cat n° V2002, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

¹⁰ Colistin, Sigma-Aldrich[®], cat n° C1511, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

¹¹ PROBAC[®] do Brasil, Anaerobac[®], Higienópolis, SP, Brasil.

Após o crescimento, quando positivas, as placas eram lavadas com 1 ml de soro fetal bovino estéril. Esse lavado era acondicionado em microtubos de 1,5 ml que eram congelados a -20 °C para posterior realização da PCR *duplex*.

3.4 PCR *DUPLEX* PARA *B. hyodysenteriae* E *B. pilosicoli*

A técnica utilizada foi a amplificação dupla para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* de acordo com o protocolo de La et al. (2003), a partir dos espécimes clínicos em estudo (colônias cultivadas). O DNA foi extraído utilizando-se o QIAamp DNA Stool Mini Kit¹² de acordo com instruções do fabricante.

Os pares de *primers* utilizados na PCR foram respectivamente: H1 (5'-ACTAAAGATCCTGATGTATTTG-3') e H2 (5'-CTAATAAACGTCTGCTGC-3') que têm como alvo a amplificação de um fragmento de 354 pb no gene *nox* da *B. hyodysenteriae*; P1 (5'-AGAGGAAAGTTTTTCGCTTC-3') e P2 (5'-GCACCTATGTAAACGTCCTTG-3') amplificando uma região de 823 pb do segmento 16S do rRNA da *B. pilosicoli*. Todos os testes da PCR foram executados em um volume de 25 µl por microtubo. O *mix* da PCR consistia de: 1X de tampão para PCR (contendo 1,5 mmol⁻¹ de MgCl₂), 1,25 U de Taq DNA polymerase¹³, 0,1 mmol⁻¹ de cada dNTP¹⁴, 0,2 µmol⁻¹ de cada de cada par de primer (H1 e H2, P1 e P2) e 2,5 µl da amostra de DNA (*template*). As condições da PCR envolveram um passo inicial de 5 min a 95°C para a ativação da Taq DNA polimerase, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 58°C por 90s e extensão a 68°C por 120s. O último passo consistiu de extensão final a 68°C por 10 min. Os produtos da PCR (*amplicons*) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TBE 1X, e marcados com brometo de etídio e revelados sob luz ultravioleta.

Os controles positivos de *B. pilosicoli* (cepa P51 - NCTC 12874) e *B. hyodysenteriae* (cepa B204T - ATCC 31212) foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Patologia Veterinária, do Departamento de Clínica e Cirurgia

¹² QIAamp DNA Stool Mini Kit, QIAGEN®, cat n° 51504, Uniscience, São Paulo, SP, Brasil.

¹³ Cenbiot, Taq. DNA polymerase, Ludwig Biotec®, Porto Alegre, RS, Brasil.

¹⁴ INVITROGEN®, dNTP set, Carlsbad, CA, EUA.

Veterinárias (DCCV), Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.5 HISTOPATOLOGIA

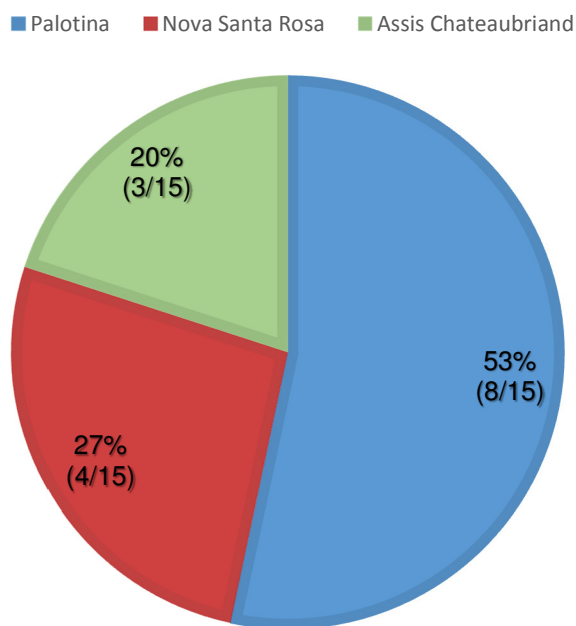
Para o exame histopatológico, três exames necroscópicos foram realizados e fragmentos de órgãos incluindo o intestino grosso e intestino delgado foram coletados e fixados em formol tamponado a 10%. Após fixação esses eram processados pela técnica histológica rotineira de desidratação e inclusão em parafina. Os tecidos parafinizados eram seccionados em 4µm de espessura e corados pela técnica de coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) (LUNA, 1968).

4. RESULTADOS

4.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

As amostras foram obtidas de 15 diferentes granjas produtoras de suínos de três municípios da mesorregião Oeste do estado do Paraná, no período de 2014 a 2015. Todas as amostras foram coletadas a campo em visita a oito granjas no município de Palotina, quatro granjas em Nova Santa Rosa e três granjas em Assis Chateaubriand, das quais se obteve 120, 60 e 45 amostras respectivamente, totalizando 225 amostras coletadas (Figura 1).

Figura 1 – Distribuição percentual de acordo com os municípios onde foram coletadas as amostras de fezes de suínos em terminação na mesorregião Oeste do estado do Paraná.



As granjas 7, 8, 10, 11, 12 e 13 (G7, G8, G10, G11, G12 e G13) não possuíam histórico de diarreia. Dentre as granjas que apresentavam relatos de diarreia (G1, G3, G6 e G15), destacou-se a granja 15 (G15) com grande quantidade de animais clinicamente acometidos, com diarreia muco hemorrágica. Nas demais foram observados poucos animais com diarreia mucosa ou muco hemorrágica.

4.2 ISOLAMENTO BACTERIANO

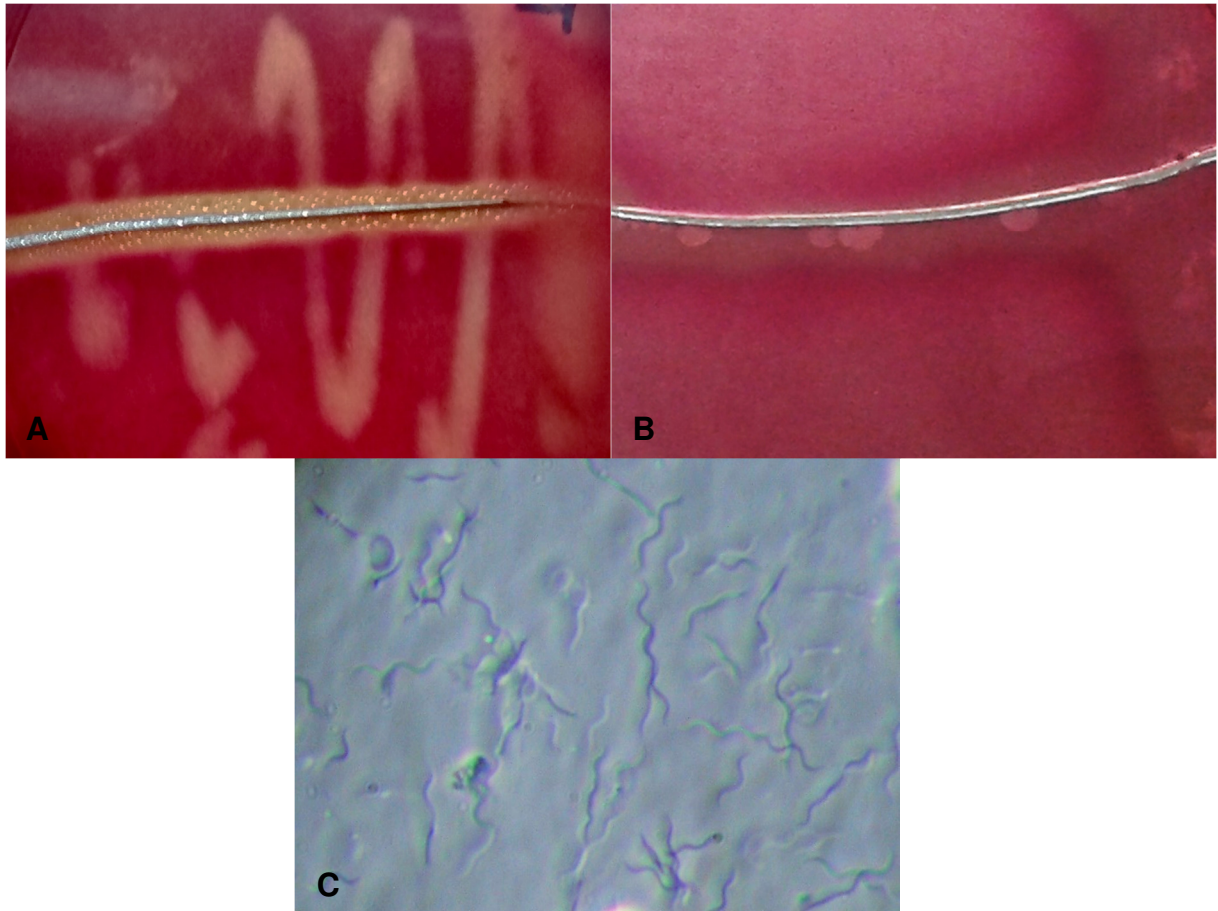
Das 225 amostras analisadas na técnica do cultivo bacteriano para o gênero *Brachyspira*, 220 foram positivas e cinco negativas. Nos casos positivos, 159 amostras apresentaram forte beta hemólise e as outras 61, comportamento hemolítico fraco (Tabela 1).

Tabela 1 – Característica do isolamento bacteriano para *Brachyspira* spp. das amostras de fezes de suínos de terminação coletadas na mesorregião Oeste do estado do Paraná.

Granjas	Características do crescimento bacteriano		
	Fortemente hemolítica	Fracamente hemolítica	Sem crescimento
G1	13	2	-
G2	15	-	-
G3	10	5	-
G4	10	5	-
G5	3	11	1
G6	4	10	1
G7	13	2	-
G8	10	5	-
G9	9	5	1
G10	15	-	-
G11	15	-	-
G12	9	5	1
G13	11	4	-
G14	7	7	1
G15	15	-	-
Total	159	61	5

No meio sólido utilizado, ágar sangue, as amostras positivas no cultivo bacteriano demonstraram beta hemólise, que ora se apresentava forte (Fig. 2A), ora apresentava aspecto hemolítico fraco (Fig. 2B). Algumas amostras foram avaliadas sob microscópio de contraste de fase e ocasionalmente demonstraram bactérias espiraladas móveis (Fig. 2C). As observações de crescimento bacteriano superficial nas áreas de hemólise foram raras.

Figura 2 – Placas de ágar sangue, áreas de forte hemólise (A) e fraca hemólise (B) nos locais de crescimento bacteriano. (C) Evidenciação de bactérias morfologicamente compatíveis com o gênero *Brachyspira* (obj. 60x).



4.3 PCR *DUPLEX*

Para a técnica da PCR foram selecionadas 10 amostras das 10 granjas com as maiores quantidades de cultivo bacteriano que resultaram em forte hemólise em ágar sangue. Realizada em 100 das 220 amostras que tiveram crescimento positivo no isolamento bacteriano, 39% (n=100) amostras foram positivas. Dessas, 61,55% (24/39) foram positivas para *B. hyodysenteriae* exclusivamente, 28,2% (11/39) foram unicamente positivas para *B. pilosicoli* e 10,25% (4/39), representando quatro amostras oriundas de três granjas distintas, foram concomitantemente positivas para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* (Tabela 2). Do total, 61% (n=100) amostras foram negativas na técnica da PCR.

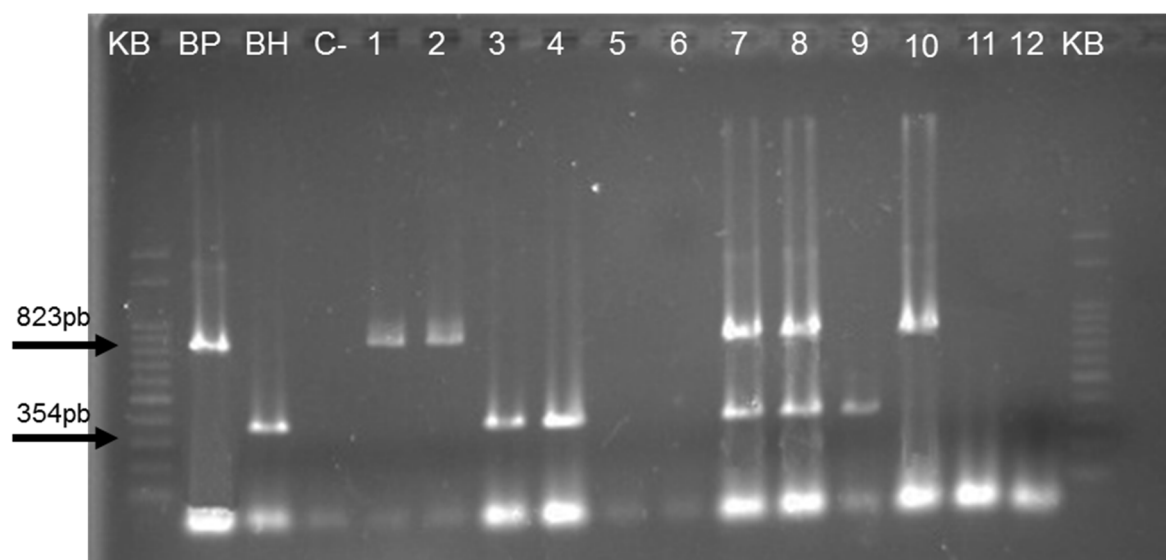
Tabela 2 – Resultado da PCR *duplex* para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* em amostras positivas no isolamento bacteriano para *Brachyspira* spp.

Granjas*	Município	Nº amostras positivas	Nº amostras negativas	PCR+		
				BP	BH	BP/BH
G1	Nova Santa Rosa	7	3	1	5	1
G2	Nova Santa Rosa	6	4	-	6	-
G3	Nova Santa Rosa	4	6	4	-	-
G4	Palotina	5	5	-	5	-
G5	Palotina	6	4	3	2	1
G7	Assis Chateaubriand	2	8	1	1	-
G8	Palotina	3	7	1		2
G10	Palotina	4	6	-	4	-
G11	Palotina	1	9	1	-	-
G15	Nova Santa Rosa	1	9	-	1	-

BP – *Brachyspira pilosicoli*; BH – *Brachyspira hyodysenteriae*. *Número de amostras por rebanho = 10

Os quatro rebanhos amostrados no município de Nova Santa Rosa apresentaram a maior quantidade relativa (4,5 amostras positivas/granja) de casos positivos na PCR, com 18 (n=39) amostras positivas na identificação para as duas espécies de *Brachyspira* estudadas. Com cinco rebanhos amostrados, o município de Palotina apresentou o maior número absoluto (19/39) de casos positivos, representando 48,72% (n=39) de amostras positivas no total com quantidade relativa de casos positivos menor (3,8 amostras positivas/granja). Por último, com apenas um rebanho amostrado, o município de Assis Chateaubriand apresentou duas (n=39) amostras positivas na PCR *duplex*, representando 5,13% do total de amostras positivas para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* (Figura 3).

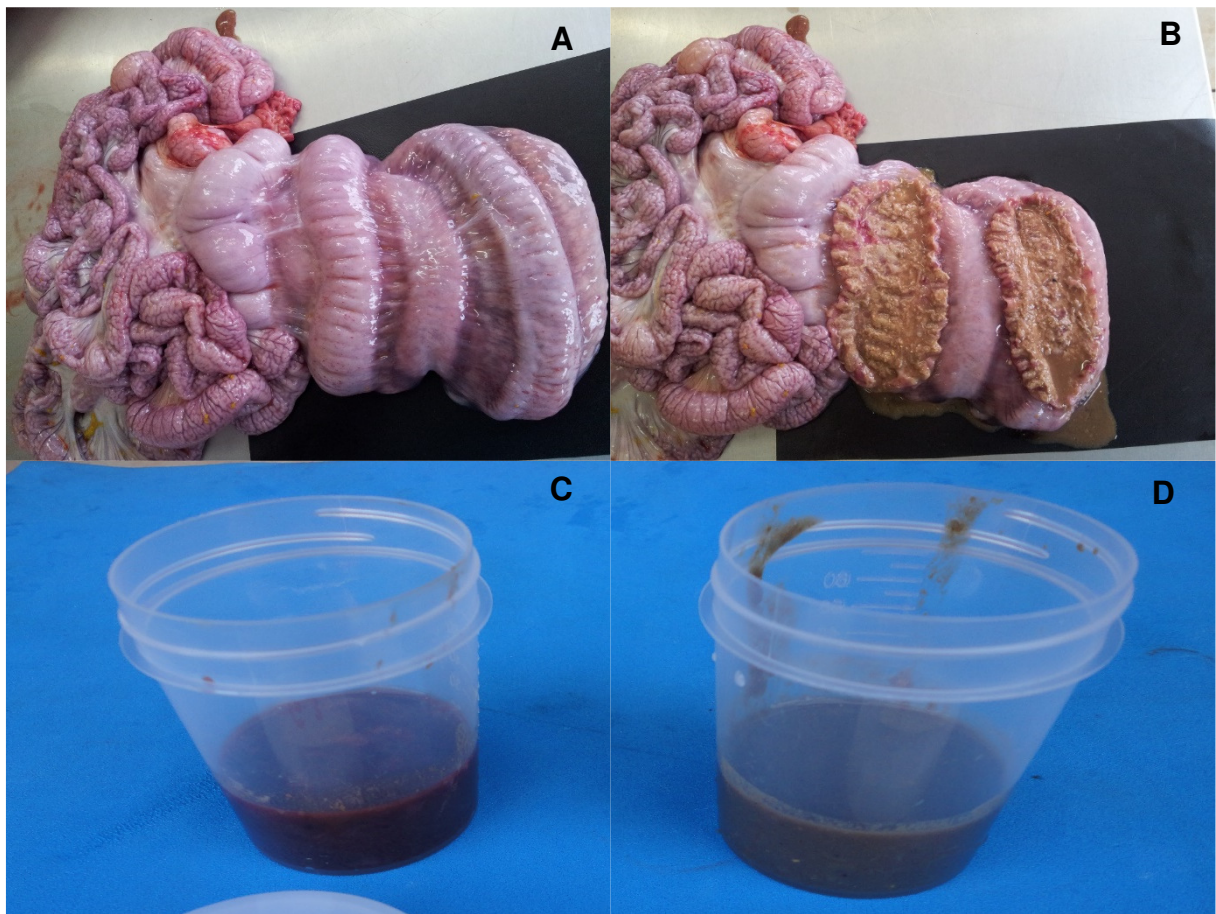
Figura 3 – Resultado PCR *duplex* Gel de agarose mostrando o tamanho dos produtos de PCR de algumas amostras coletadas a campo, *Brachyspira pilosicoli* 823 pb (BP); *Brachyspira hyodysenteriae* 354 pb (BH); Kb, marcador de peso molecular e C-, controle negativo. Linhas 1, 2 e 10 detecções de *Brachyspira pilosicoli*, linhas 3, 4 e 9 detecções de *Brachyspira hyodysenteriae*, linhas 5, 6, 11 e 12 amostras negativas e linhas 7 e 8 detecções mista por *Brachyspira pilosicoli* e *Brachyspira hyodysenteriae*.



4.4 ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS

Foi possível realizar a necropsia de somente três animais com sinais clínicos de diarreia, sendo estes oriundos de uma granja do município de Nova Santa Rosa (G1). Macroscopicamente, notava-se intenso edema do mesocólon espiral e petéquias multifocais leves na serosa (Fig. 4A). Na mucosa intestinal, havia hiperemia leve (02/03) a acentuada (01/03) com presença de filamentos de fibrina e restos necróticos aderidos à mucosa (Fig. 4B). Em dois dos animais notava-se conteúdo intestinal fluido com moderada a acentuada quantidade de muco, associado à presença de sangue (Fig. 4C) ou não (Fig. 4D). Esses animais apresentaram isolamento e PCR positiva para *B. pilosicoli* (2/3) e *B. hyodysenteriae* (1/3).

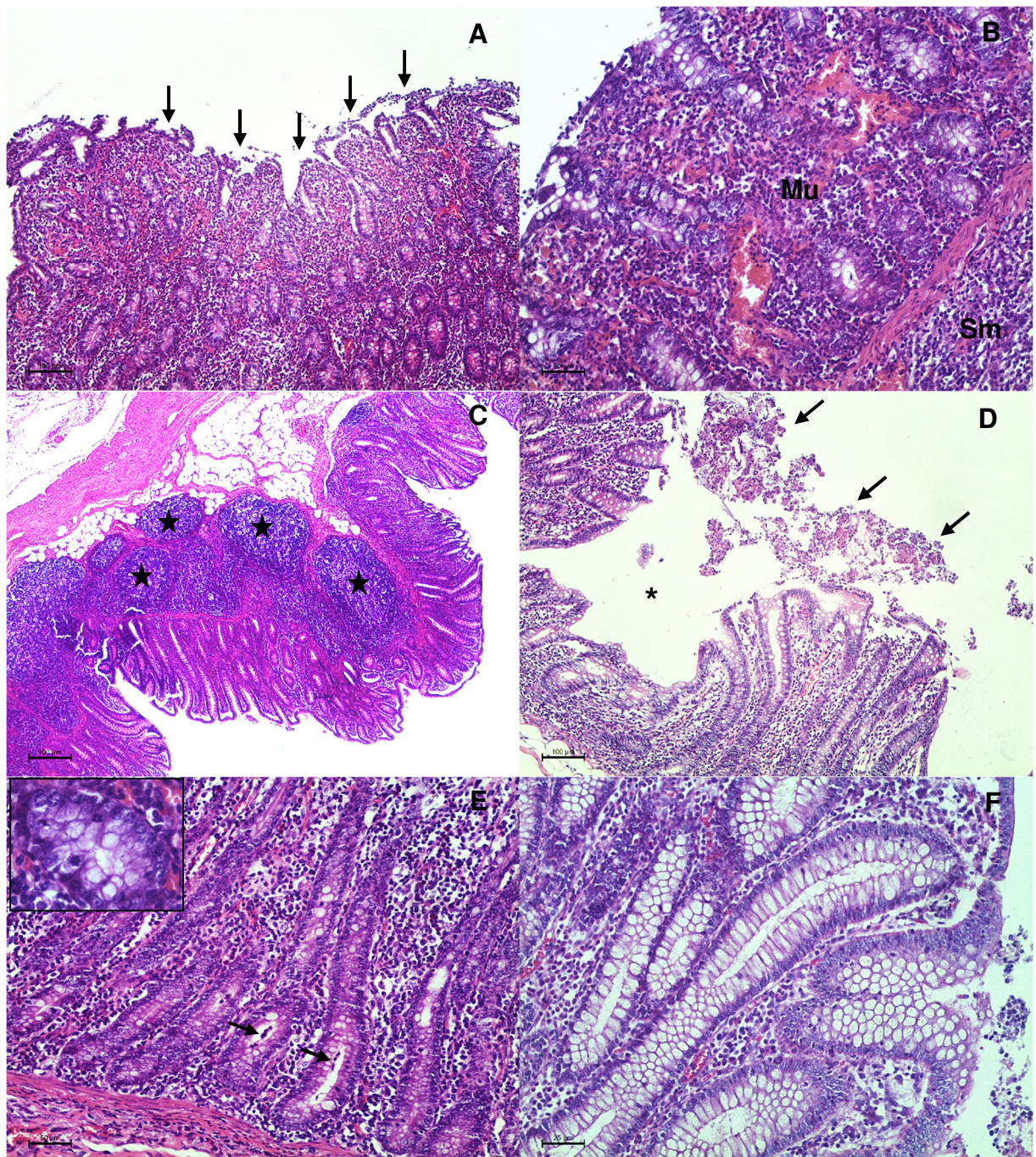
Figura 4 – Colite espiroquetal e disenteria suína no Paraná. (A) Edema de mesocólon espiral. (B). Colite fibrino necrótica acentuada. (C) Conteúdo intestinal fluido e hemorrágico. (D) Conteúdo intestinal fluido e mucoso.



Fragmentos de intestino grosso dos suínos necropsiados foram processados para avaliação histopatológica. As alterações observadas variaram discretamente na intensidade, sendo que uma amostra apresentou lesões mais brandas e as outras duas, lesões mais severas. As variações de intensidade foram evidenciadas em: 1) integridade do epitélio intestinal; 2) infiltrado inflamatório; e 3) alterações circulatórias (hiperemia e hemorragia). Comumente, na mucosa, foi observada distensão moderada a acentuada da lâmina própria devido ao infiltrado inflamatório difuso moderado a acentuado constituído por linfócitos, histiócitos, plasmócitos e eosinófilos. No epitélio superficial observou-se erosões e necrose difusa moderada com descamação de células epiteliais, acúmulo de células inflamatórias e restos celulares na luz intestinal. Entremeando o epitélio intestinal remanescente foram evidenciadas células caliciformes dilatadas e proliferadas, que na base da mucosa integravam criptas dilatadas, por vezes com material necrótico na luz. Na submucosa notou-se hiperplasia moderada a acentuada do tecido linfóide associado

à mucosa (MALT) e infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário difuso leve a moderado (Figura 5).

Figura 5 – Suínos de terminação infectados por *Brachyspira hyodysenteriae* no estado do Paraná. (A) Colite erosiva difusa moderada caracterizada pela necrose e desprendimento do epitélio superficial da mucosa (setas) HE, obj. 10x. (B) Na mucosa (Mu), nota-se infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário difuso acentuado distendendo a lâmina própria e hiperemia difusa moderada; infiltrado inflamatório semelhante também pode ser observado na submucosa (Sm) HE, obj. 10x. (C) Cólon, hiperplasia de MALT difusa acentuada (estrelas) HE, obj. 10x. (D) Erosão e úlcera focal (asterisco) com liberação de grande quantidade de debris celulares para a luz intestinal (setas) HE, obj. 10x. (E) Criptas intestinais, dilatação difusa moderada com restos celulares na luz (setas) e necrose individual de enterócitos (detalhe) HE obj. 20x. (F) Hiperplasia de células caliciformes difusa acentuada HE obj. 20x.



5. DISCUSSÃO

Apesar dos agentes enteropatogênicos serem importantes causadores de prejuízo na suinocultura e a sua identificação, distribuição e informações epidemiológicas constituírem informações relevantes para o controle dos mesmos, o estado do Paraná não apresenta dados referentes à prevalência dos principais enteropatógenos causadores de diarreia em suínos, sendo este o primeiro estudo a investigar a frequência de *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* no Paraná. A mesorregião Oeste do estado, onde estão localizados os municípios deste trabalho, é parte componente do segundo maior estado produtor e terceiro maior exportador carne suína no país, superado apenas pelo estado de Santa Catarina e Rio Grande dos Sul, respectivamente (IBGE, 2015).

A alta densidade de unidade produtoras, característica diretamente associada a maiores níveis produtivos, aumentam o potencial de transmissão da enfermidade devido à proximidade geográfica entre os rebanhos, maior fluxo de veículos (caminhões para transporte de ração e animais) e circulação de vetores entre as granjas próximas (MUNIAPPA et al., 1997; BOYE et al., 1998; THOMSON et al., 1998; CALDERARO et al., 2001; HAMPSON et al., 2006; HAMPSON E TROTT, 2006). O município de Nova Santa Rosa, incluído na presente pesquisa, é reconhecido pela grande concentração de granjas suinícolas, possuindo inclusive Unidades Produtoras de Leitões (UPLs), o que possivelmente justifique o maior número de animais infectados para as duas espécies de *Brachyspira* sp. patogênicas estudadas e maior quantidade de animais clinicamente acometidos. Cenário corroborado pelo cultivo bacteriano positivo para o gênero *Brachyspira* em todas as 60 amostras coletadas em quatro granjas desse município, com 53 (88,33%) amostras apresentando hemólise forte em ágar sangue e outras 7 (11,66%), hemólise fraca.

Um estudo sobre a disenteria suína no Brasil relatou 18 novos surtos da doença entre os anos de 2010 e 2014, ocorridos nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste do país (DANIEL, 2014). O estado do Paraná foi incluído, contabilizando dois surtos isolados entre os anos de 2010 e 2011. O estado de Santa Catarina se

destacou pelo maior número de surtos, cinco ao todo, sendo que dados epidemiológicos sugerem que a contaminação de uma granja multiplicadora terceirizada no Oeste do estado tenha fornecido fêmeas de reposição clinicamente saudáveis, mas infectadas, para várias UPLs de diferentes empresas de integração (DANIEL et al., 2013). Com histórico semelhante, o presente estudo revelou que 11 das 15 granjas avaliadas recebiam leitões de propriedades “iniciadoras de campo”, UPLs reconhecidas pelas más condições sanitárias. Algumas dessas unidades, sabidamente infectadas por *Brachyspira* spp., forneciam leitões para produtores de Nova Santa Rosa, o que possivelmente explique o maior número de casos positivos pela PCR *duplex* (18/39) nas amostras oriundas desse município. Embora não se possa afirmar no presente caso, o contexto epidemiológico reforça a possibilidade de que as UPLs contaminadas tenham disseminado as doenças para a região estudada.

O isolamento bacteriano é reconhecido como o procedimento diagnóstico “padrão ouro” para identificação das espécies do gênero *Brachyspira* (KENNEDY et al., 1988; FELLSTROM et al., 1997; FELLSTROM et al., 2001b; HARRIS et al., 2006; STANTON, 2006). Teste altamente sensível, capaz de detectar a presença de apenas uma espiroqueta em condições de conservação ideais (FELLSTRÖM et al., 2001a), o isolamento bacteriano é a técnica eletiva quando o objetivo é o estudo abrangente das bactérias que compõem o gênero *Brachyspira*. Embora o crescimento de outras espécies do gênero *Brachyspira* não fosse a proposta principal, certamente o cultivo bacteriano favoreceu a seleção e crescimento dos microrganismos protagonistas do presente trabalho juntamente com outras espécies de *Brachyspira*.

A fase aguda das doenças entéricas causadas pelas espiroquetas do gênero *Brachyspira* caracteriza-se pela diarreia clínica e eliminação dos microrganismos em quantidades detectáveis ao cultivo bacteriano (NEEF et al., 1994b). Na fase assintomática, os animais excretam os patógenos nas fezes em níveis detectáveis ocasionalmente, reduzindo a sensibilidade do teste e dificultando a identificação das espiroquetas patogênicas (STEGE et al., 2000). Na presente pesquisa, poucas amostras foram provenientes de animais com diarreia e o cultivo revelou crescimento bacteriano compatível com espiroquetas do gênero *Brachyspira* em

todas as amostras, o que pode ser atribuído à alta sensibilidade do teste além de indicar a eliminação de quantidade detectáveis de *Brachyspira* spp. nas fezes.

Em áreas endêmicas, como é o caso do presente estudo, o uso de antimicrobianos é uma conduta rotineira na profilaxia e tratamento das espiroquetoses suínas, o que pode reduzir consideravelmente a excreção de organismos viáveis à detecção no cultivo (HARRIS et al., 2006). Os antimicrobianos frequentemente utilizados no tratamento das doenças causadas por *Brachyspira* spp. incluem valnemulina, carbadox, doxiciclina, tilvalosina, tilosina, lincomicina e tiamulina (CIZEK et al., 1998; DUHAMEL et al., 1998; HOMMEZ et al., 1998; FOSSI et al., 1999; KARLSSON et al., 2004; CLOTHIER et al., 2011; HIDALGO et al., 2011). Cepas de *B. hyodysenteriae*, isoladas dos principais e mais recentes surtos de disenteria suína no Brasil, demonstraram boa sensibilidade quando expostas ao antimicrobiano tiamulina em estudo de determinação da susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* (DANIEL, 2014). No presente estudo, todas as amostras foram provenientes de rebanhos que profilaticamente recebiam ração medicada e uma alta dosagem adicional do antimicrobiano tiamulina entre 70 e 80 dias após alojados nas instalações de terminação. Apesar disto, foram encontrados casos de doença clínica e cultivo bacteriano fenotipicamente compatíveis com as doenças causadas pelas *Brachyspiras* sp., o que sugere um cenário produtivo possivelmente exposto a uma alta pressão de infecção e ao surgimento de cepas resistentes aos fármacos utilizados, no presente caso, a tiamulina.

Sabe-se que a *B. hyodysenteriae* possui um agente de transferência gênica (*gene transfer agent* – GTA), semelhante a um prófago, nomeado de VSH-1 (vírus da *Serpulina hyodysenteriae*), que está envolvido na transferência natural de genes e recombinação dentre espécies. A real importância dessa troca de material genético não está totalmente esclarecida, porém acredita-se que o GTA esteja envolvido na transferência de genes de resistência a determinados antimicrobianos dentro de uma população de bactérias (MOTRO et al., 2009). Devido a isso tem-se buscado formas alternativas de controle das bactérias do gênero *Brachyspira*. No Brasil, determinadas empresas têm utilizado produtos fitoterápicos via ração, tanto na forma preventiva como curativa. Entre os fitoterápicos utilizados, merece destaque o Dysantic® elaborado à base de tomilho, alfarroba e orégano e empregado em todas as granjas desse experimento. Porém como podemos

perceber, o fitoterápico não elimina as bactérias do gênero *Brachyspira* das fezes, somente suprime os sinais clínicos o que permite a perpetuação do agente no ambiente e no animal.

Alguns autores sugerem a utilização do cultivo bacteriano e a PCR associados para determinar as espécies do gênero *Brachyspira* em amostras de fezes, pois reúnem a especificidade do teste molecular à sensibilidade do cultivo com a multiplicação prévia da bactéria (FELLSTRÖM E GUNNARSSON, 1995; FELLSTRÖM et al. 1997; FELLSTRÖM et al., 2001b). Neste estudo, essa combinação de testes foi utilizada para identificar a presença das duas espécies reconhecidamente patogênicas, *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae*.

Embora a técnica de PCR seja relatada como um bom recurso de diagnóstico em estudos epidemiológicos pela capacidade de identificar animais com infecções subclínicas (LADINIG et al., 2009), o presente estudo diverge apresentando resultado negativo na maioria das amostras (61%). Com poucos animais que apresentavam a doença clínica, maior parte dos rebanhos (6/10) avaliados pela PCR no presente trabalho apresentavam histórico de diarreia sugestiva de infecção por bactérias do gênero *Brachyspira*, semelhante a um trabalho realizado no estado de Minas Gerais com 39 amostras de fezes (NEVES, 2012). No entanto, o presente trabalho encontrou apenas 39% de amostras positivas, resultado distante dos 71,7% encontrado por Neves (2012). A utilização de DNA extraído de cultivos bacterianos propicia maior eficiência na avaliação pela PCR (RÅSBÄCK et al., 2006; BURROUGH et al., 2012; DANIEL, 2014), entretanto tal fato não foi observado no presente estudo. Os baixos números obtidos pela PCR desta pesquisa podem ser parcialmente explicados pelo fato de o DNA utilizado para os testes ser proveniente de culturas bacterianas não purificadas, o que é corroborado por La et al. (2003). Elucidando outra provável explicação, Boye et al. (2001) e La et al. (2003) relataram que resultados negativos podem também ser atribuídos ao dano ou quantidade insuficiente de DNA na amostra.

O uso de amostras de DNA oriundo de cultivo bacteriano inicial, conforme as analisadas no presente trabalho, podem gerar maior quantidade de resultados negativos na PCR *duplex* quando comparado com os resultados obtidos ao testar DNA extraído diretamente de amostras de fezes (LA et al., 2003). Fato que possivelmente tenha sido corroborado pelos resultados encontrados nas amostras

testadas no presente trabalho. Destaca-se dentre os resultados negativos na PCR do presente estudo, a granja 15 (G15), inserida em região sabidamente contaminada (município de Nova Santa Rosa), que apresentou grande número de animais com diarreia muco hemorrágica e cultivo bacteriano positivo para *Brachyspira* sp. em todas as 15 amostras coletadas, com predomínio de amostras em hemólise forte. No entanto, das dez amostras analisadas na PCR *duplex* apenas uma foi positiva (*B. hyodysenteriae*), indicando a presença de quantidades inadequadas de DNA, provavelmente muito acima da concentração ideal, entre 10^3 e 10^4 espiroquetas na amostra (ATYEO et al., 1998; LA et al., 2003).

São descritas oficialmente cinco espécies de *Brachyspira* encontradas no intestino grosso de suínos (DUHAMEL, 2011). Historicamente, três dessas espécies, *B. intermedia*, *B. innocens* e *B. murdochii* têm sido consideradas comensais e frequentemente isoladas de amostras de fezes de suínos saudáveis. No entanto, já existem relatos de colite catarral sendo causada por *B. murdochii* em condições naturais (WEISSENBOCK et al., 2005) e experimentais (JENSEN et al., 2010). Deste modo, é possível que o alto número de amostras negativas para *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae* na PCR *duplex* possa decorrer do alto número de *Brachyspiras* apatogênicas ou até mesmo patogênicas não identificadas em meio aos isolados bacterianos.

A escassez de identificações positivas de *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* na PCR *duplex* realizada com amostras positivas no cultivo bacteriano, oriundas de animais em curso clínico de diarreia suscita a alegação de existência de espécies de *Brachyspira* sp. patogênicas, fortemente hemolíticas ainda desconhecidas (GEBHART E PRIMUS, 2011). Diante da ausência de testes moleculares padronizados e impossibilidade de tipificação dessas espécies, estes autores sugeriram a expressão “*Novel Strongly Hemolytic Brachyspira species – NSH*” (novas espécies de *Brachyspira* fortemente hemolíticas) com base no potencial patogênico e produção de hemólise forte em ágar sangue. Dentre as espécies que tem sido diferenciadas geneticamente da *B. hyodysenteriae* (ATYEO et al., 1999), já se conhecem as seguintes terminologias propostas: “*Brachyspira suanatina*”, “*Brachyspira* sp. SASK30446” e “*Brachyspira intermedia* atípica” (RÅSBÄCK et al., 2007; BURROUGH et al., 2012). Em estudos mais recentes, por meio de provas bioquímicas, moleculares e comparações filogenéticas, Chander et al. (2012)

propuseram a denominação “*Brachyspira hampsonii*”, posteriormente reclassificada em “*Brachyspira hampsonii* subtipo I e *Brachyspira hampsonii* subtipo II (VANUCCI E GEBHART, 2013).

A avaliação anatomopatológica dos animais submetidos ao exame necroscópico revelou lesões macroscópicas e histopatológicas esperadas, de acordo com a literatura (HAMPSON et al., 1997; TAYLOR E TROTT, 1997; JACOBSON et al., 2004; HAMPSON et al., 2006). As alterações macroscópicas associadas ao cultivo bacteriano positivo é uma condição diagnóstica frequentemente encontrada, apesar de haver relato de cultivo bacteriano positivo mesmo na ausência de lesões macroscópicas evidentes (DANIEL, 2014). No presente estudo, houve concordância entre lesões macroscópicas, técnicas do cultivo bacteriano e da PCR.

6. CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo a investigar a frequência de *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* no estado do Paraná. Além da identificação dos dois principais agentes enteropatogênicos e respectiva associação com a doença clínica na suinocultura paranaense, o presente trabalho chegou às seguintes conclusões:

- Frequência de 24% de *Brachyspira hyodysenteriae*, 11% de *Brachyspira pilosicoli* e 4% da presença concomitante dos dois patógenos;
- A associação do cultivo bacteriano com a técnica da PCR *duplex* demonstrou-se eficiente na identificação de *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* em suínos;
- Possibilidade do envolvimento de “novas espécies de *Brachyspira*” patogênicas em casos clínicos em que a *B. hyodysenteriae* não foi diagnosticada;
- Presença da doença clínica em rebanhos suínos, apesar do intenso uso de medicamentos profiláticos.

REFERÊNCIAS

ARGENZIO, R. A., WHIPP, S. C. & GLOCK, R. D. **Pathophysiology of swine dysentery: Colonic transport and permeability studies.** J. Infect. Dis., v. 142, p. 676-684, 1980.

ATYEO, R. F., OXBERRY, S. L., COMBS, B. G. et al. **Development and evaluation of polymerase chain reaction tests as an aid to diagnosis of swine dysentery and intestinal spirochaetosis.** Lett. Appl. Microbiol., v. 26, p. 126-130, 1998.

ATYEO, R. F., STANTON, T. B., JENSEN, N. S., et al. **Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (Nox) sequence comparisons and Nox-based polymerase chain reaction tests.** Vet. Microbiol., v. 67, p. 47-60, 1999.

BACCARO, M. R., SHINYA, L. T., MORENO, A. M. et al. **Detecção de *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* através da coloração de Ryu, imunofluorescência indireta e da PCR.** In: Anais do IX Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Belo Horizonte, Brasil, p. 191-192, 1999.

BACCARO, M. R., MORENO, A. M., SHINYA, L. T. et al. **Identification of bacterial agents of enteric diseases by multiplex PCR in growing-finishing pigs.** Braz. J. Microbiol., v. 34, p. 225-229, 2003.

BARCELLOS, D. E. S. N., BOROWSKI, S. M. & DE OLIVEIRA, S. J. **Causas de diarreia em leitões na fase de recria.** In: Anais do VII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Blumenau, Brasil, p. 87, 1995.

BARCELLOS, D. E. S. N. **Estudos Bacteriológicos e epidemiológicos sobre a infecção por *Brachyspira* spp. em suínos.** Rio de Janeiro, 163p. Tese (Doutorado em ciências Microbiológicas) – Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

BARCELLOS, D. E. S. N., MATHIESEN, M. R., UZEDA, M. et al. **Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil.** Vet. Rec., v. 146, p. 398-403, 2000.

BARCELLOS, D. E. S. N., RAZIA, L. E. & BOROWSKI, S. M. **Ocorrência e identificação de espiroquetas intestinais em suínos em granjas de porte**

industrial em duas regiões criatórias do RS, em relação à medicação da ração. Ciência Rural, v. 33, n. 5, p. 725-729, 2003.

BARCELLOS, D. E. S. N., SOUZA, R. F., OLIVEIRA FILHO, J. X. et al. **Diarreias causadas pela infecção com *Brachyspira* spp. em suínos.** Act. Sci. Vet., v. 38, p. 229-245, 2010.

BOYE, M., JENSEN, T. K., MØLLER, K. et al. **Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestines by fluorescent rRNA in situ hybridization.** Mol. Cell. Probe., v. 12, p. 323-330, 1998.

BOYE, M., BALODA, S. B., LESER, T. D. et al. **Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms.** Vet. Microbiol., v. 81, p. 33-40, 2001.

BURROUGH, E. R., STRAIT, E. L., KINYON, J. M. et al. **Comparative virulence of clinical *Brachyspira* spp. isolates in inoculated pigs.** J. Vet. Diagn. Invest., v. 24, n. 6, p. 1025-1034, 2012.

CALDERARO, A., MERIALDI, G., PERINI, S. et al. **A novel method for isolation of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* from pigs with swine dysentery in Italy.** Vet. Microbiol., v. 80, p. 47-52, 2001.

CARVAJAL, A., DE ARRIBA, M. L., RODRIGUEZ, H. et al. **Prevalence of *B. hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* infections amongst Spanish swine herds with diarrhoea.** In Proc. 2nd Int. Conf. Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Eddleston, Scotland, 43p, 2003.

CHANDER, Y., PRIMUS, A., OLIVEIRA, S. et al. **Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated "*Brachyspira hampsonii*".** J. Vet. Diagn. Invest., v. 24, n. 5, p. 903-910, 2012.

CIZEK, A., SMOLA, J. & MÁDR, P. **In vitro activity of six anti-dysenteric drugs on *Serpulina hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* strains isolated in the Czech Republic.** In Proceedings of the 15th Int. Pig Vet. Soc. Cong, Birmingham, UK, 135, 1998.

CLOTHIER, K. A., KINYON, J. M., FRANA, T. S. et al. **Species characterization and minimum inhibitory concentration patterns of *Brachyspira* species isolates from swine with clinical disease.** J. Vet. Diag. Invest. 23, 6, 1140-1145, 2011.

DANIEL, A. G., SATO, J. P. H., RESENDE T. P. et al. **Infecção por *Brachyspira* sp. em suínos no Brasil.** 131-139. In: Simpósio Internacional de Suinocultura, VIII. Porto Alegre. Anais. Porto Alegre: VIII SINSUI, p.131-139, 2013.

DANIEL, A. G. S. **Determinação dos padrões de Concentração Mínima Inibitória (MIC) e caracterização genotípica de cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos com quadros clínicos de disenteria suína no Brasil.** Belo Horizonte, 39f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

DEWEY, C. E. **Ration induced diarrhea in grower pigs.** J. Swine. Health. Prod. 1, 1621, 1993.

DRÉAU, D., LALLÉS, J. P., PHILOUZE-ROMÉ, V. et al. **Local and systemic immune responses to soybean protein ingestion in early-weaned pigs.** J. Anim. Sci., v. 72, p. 2090-2098, 1994.

DUHAMEL, G. E., KINYON, J. M., MATHIESEN, M. R. et al. **Prevalence of porcine colonic spirochetosis in a multiple-site production system and microbial sensitivity patterns of *Serpulina pilosicoli*.** Anais 39th American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Meeting, Arkansas, p.45. 1996.

DUHAMEL, G. E., KINYON, J. M., MATHIESEN, M. R. et al. **In vitro activity of four antimicrobial agents against North American isolates of porcine *Serpulina pilosicoli*.** J. Vet Diag. Invest., v. 10, p. 350-356, 1998.

DUHAMEL, G. E. **Comparative pathology and pathogenesis of naturally acquired and experimentally induced colonic spirochetosis.** An. H. Res. Rew., v. 2, p. 3-17, 2001.

DUHAMEL, G. E., CARVAJAL A., DE ARRIBA, M. L. et al. **Prevalence of *Brachyspira* species in pigs with diarrhoea in Spain.** Vet. Rec., v. 158, p. 700-701, 2006.

DUHAMEL, G. E. **Impact of colonic *Brachyspira* spirochete host range on transmission of multidrug resistant clinical isolates.** In: Proceedings Carlos Pijoan Symposium on Swine Dysentery, Saint Paul, Minnesota, p. 1-4, 2011.

DURMIC, Z., PETHICK, D. W., PLUSKE, J. R., et al. **Changes in bacterial populations in the colon of pigs fed different sources of dietary fibre, and the development of swine dysentery after experimental infection.** J. Appl. Microbiol., v. 85, p. 574-582, 1998.

ELDER, R. O., DUHAMEL, G. E., SCHAFER, R. W. et al. **Rapid detection of *Serpulina hyodysenteriae* in diagnostic specimens by PCR.** J. Clin. Microbiol., v. 32, p. 1497-1502, 1994.

FEBERWEE, A., HAMPSON, D. J., PHILLIPS, N. D. et al. **Identification of *Brachyspira hyodysenteriae* and Other Pathogenic *Brachyspira* Species in Chickens from Laying Flocks with Diarrhea or Reduced Production or Both.** J. Clin. Microbiol., v. 46, n. 2, p. 593-600, 2008.

FELLSTROM, C. & GUNNARSSON, A. **Phenotypical characterisation of intestinal spirochaetes isolated from pigs.** Res. Vet. Sci., v. 59, p. 1-4, 1995.

FELLSTROM, C. B., PETTERSON, K. E., JOHANSSON, N. et al. **Prevalence of *Serpulina* species in relation to diarrhea and feed medication in pig-rearing herds in Sweden.** Am. J. Vet. Res., v. 57, p. 807-811, 1996.

FELLSTROM, C., PETTERSSON, B., THOMPSON et al. **Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR.** J. Clin. Microbiol., v. 35, p. 462-467, 1997.

FELLSTRÖM, C., PETTERSSON, B., ZIMMERMAN, U. et al. **Classification of *Brachyspira* spp. isolated from Swedish dogs.** Anim. Health Res. Rev., v. 2, n. 1, p. 75-82, 2001a.

FELLSTRÖM, C., ZIMMERMAN, U., ASPAN, A. et al. **The use of culture, pooled samples and PCR for identification of herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*.** Anim. Health Res. Rev., v. 2, n. 1, p. 37-43. 2001b.

FOSSI, M., SARANPAA, T. & RAUTIAINEN, E. **In vitro sensitivity of the swine *Brachyspira* species to tiamulin in Finland 1995-1997.** Acta Vet. Scand., v. 40, p. 355-358, 1999.

GEBHART, C., PRIMUS, A. **Brachyspira species: Diagnostic and Molecular Epidemiology**. In: CARLOS PIJOAN SYMPOSIUM ON SWINE DYSENTERY. Saint Paul. Anais. Saint Paul, Minnessota, p. 15-17, 2011.

GIRARD, C., LEMARCHAND, T., HIGGINS, R. **Porcine colonic spirochetosis: a retrospective study of eleven cases**. Can. Vet. J., v. 36, p. 291-294, 1995.

GIRARD, C. & HIGGINS, R. **Colonic spirochetosis in piglets**. Can. Vet. J., v. 30, p. 68, 1989.

GUEDES, R. M. C. **Diarreia em suínos de recria e terminação principais enfermidades**. Suíno Cia., v. 11, p. 11-18, 2005.

GUEDES, R. M. C. **Controle racional das diarreias de recria e terminação**. Acta Scientiae Veterinariae. v. 38, supl. 1, p. 247-253, 2010.

GUEDES, R. M. C. & BARCELLOS, D. E. S. N. Colite espiroquetal. In: **Doenças dos suínos**. Edited by: BARCELLOS, D. E. S. N., SOBESTIANSKY, J. Goiânia, Canone. 2 ed., p. 128-134, 2012a.

GUEDES, R. M. C. & BARCELLOS, D. E. S. N. Disenteria suína. In: **Doenças dos suínos**. Edited by: BARCELLOS, D. E. S. N., SOBESTIANSKY, J. Goiânia, Canone. 2 ed., p. 128-134, 2012b.

HAMPSON, D. J., COMBS, B. G., HARDERS, S. J. et al. **Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from a wild rat living on a piggery**. Aust. Vet. J., v. 68, p. 308, 1991.

HAMPSON, D. J. & TROTT, D. J. **A review – Intestinal spirochetel infections of pigs: an overview with an Australian perspective**. In: Manipulating Pig Production Werribee: Australian Pig Science Association. Edited by: HENESSY, D. P. & CRANWELL, P. D. V. 139-169, 1995.

HAMPSON, D. J., ATYEO, R. F. & COMBS, B. G. Swine Dysentery. In: HAMPSON, D. J. & STANTON, T. B (Ed). **Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans**. 1. ed. Wallingford, Oxon: CAB International, cap. 7, p.175-210, 1997.

HAMPSON, D. J. & TROTT, D. J. Spirochetal Diarrhea/Porcine Intestinal Spirochetosis. In: **Diseases of Swine**. 9. ed., Edited by: STRAW, B. E., ZIMMERMAN, J. J., D'ALLAIRE, S. et al. Ames, Iowa, Blackwell Publishing, cap. 40, p. 553-562, 2006.

HAMPSON, D. J., FELLSTRON, M. C. & THOMSON, J. R. Swine dysentery. In: **Diseases of Swine**. 9 ed., Edited by: STRAW, B. E., ZIMMERMAN, J. J., D'ALLAIRE, S. et al. Ames, Iowa, Blackwell Publishing, cap. 48, p. 785-805, 2006.

HARRIS, D. L., GLOCK, R. D., CHRISTENSEN, C. R. et al. **Swine dysentery. I. Inoculation of pigs with *Treponema hyodysenteriae* (new species) and reproduction of the disease.** Vet. Med. Small. Anim. Clin., v. 67, p. 61-64, 1972.

HARRIS, D. L., HAMPSON, D. J. & GLOCK, R. D. **Diseases of Swine**. 9 ed., Edited by: STRAW, B. E., ZIMMERMAN, J. J., D'ALLAIRE, S. et al. Ames, Iowa, Blackwell Publishing, cap. 42, p. 579-600, 2006.

HARRISSON, L. R.; GOSSER, H. S. **Demonstration of spirochaetes in formalized tissues using Dieteler's silver stain.** In: Annual meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 22, Columbia, Anais. Columbia: American association of veterinary laboratory diagnosticians (AAVLD), p. 373-378, 1979.

HIDALGO, A., CARVAJAL, A., VESTER, B. et al. **Trends towards lower antimicrobial Susceptibility and characterization of acquired resistance among clinical isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain.** Antimicrob. Agents. Chemother., v. 55, n. 7, p. 3330-3337, 2011.

HOMMEZ, J., CASTRYCK, F., MIRY, C., et al. **Susceptibility of different *Serpulina* species in pigs to antimicrobial agents.** Vlaams. Diergen. Tijds., v. 67, p. 32-35, 1998.

HUDSON, M. J., ALEXANDER, T. J. L., LYSONS, R. J. **Diagnosis of swine dysentery: Spirochaetes which may be confused with *Treponema hyodysenteriae*.** Vet. Rec., v. 99, p. 498-500, 1976.

IBGE. **Estatística da produção pecuária setembro de 2015.** Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa Trimestral do Abate de Animais, 2014/2015. 11-16, Brasil, 2015.

INSTITUTO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS DESIDÉRIO FINAMOR. **Diagnóstico da disenteria suína e isolamento do *Treponema hyodysenteriae* no Rio Grande do Sul.** Boletim Técnico, nº 5, p. 5, 1978.

JACOBSON, M. FELLSTROM, C., LINDBERG, R. et al. **Experimental swine dysentery: comparison between infection models.** J. Med. Microbiol., v. 53, p. 273–280, 2004.

JACOBSON, M., GERTH LÖFSTEDT, M., HOLMGREN, N.; et al. **The prevalences of *Brachyspira* spp and *Lawsonia intracellularis* in Swedish piglet producing herds and wild board population.** J. Vet. Med., v. 52, p. 386-391, 2005.

JANSSON, D. S., BROJER, C., GAVIER-WIDÉN, et al. ***Brachyspira* spp. (*Serpulina* spp.) in birds: a review and results from a study of Swedish game birds.** Anim. Health Res. Rev. v. 2, n. 1, p. 93-100, 2001.

JANSSON, D. S., JOHANSSON, K., OLOFSSON, T. et al. ***Brachyspira hyodysenteriae* and other strongly-haemolytic and indole-positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*).** J. Med. Microbiol., v. 53, 293-300, 2004.

JANSSON, D. S., RASBACK, T., FELLSTROM, C. et al. **Experimental challenge of Mallards (*Anas platyrhynchos*) with *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira suanatina* isolated from Pigs and Mallards.** J. Comp. Path. v. 141, p. 211-222, 2009.

JENSEN, T. K., BOYE, M., MOLLER, K., et al. **Association of *Serpulina hyodysenteriae* with the colonic mucosa in experimental swine dysentery studied by fluorescent in situ hybridization.** APMIS., v. 106, n. 11, p. 1061-1068, 1998.

JENSEN, T. K., MØLLER, K., BOYE, M., et al. **Scanning electron microscopy and fluorescent in situ hybridization of experimental *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* infection in growing pigs.** Vet Pathol., v. 37, n. 1, p. 22-32, 2000.

JENSEN, T. K., BOYE, M., AHRENS, P. et al. **Diagnostic examination of human intestinal spirochetosis by fluorescent in situ hybridization for *Brachyspira aalborgi*, *Brachyspira pilosicoli*, and other species of the genus *Brachyspira* (*Serpulina*).** J. Clin. Microbiol., v. 39, n. 11, p. 4111-4118, 2001.

JENSEN, T. K., CHRISTENSEN, A. S., BOYE, M. ***Brachyspira murdochii* colitis in pigs.** Vet. Path., v. 47, n. 2, p. 334-338, 2010.

JOENS, L. A., GLOCK, R. D., WHIPP, S. C., et al. **Location of *Treponema hyodysenteriae* and synergistic anaerobic bacteria in colonic lesions on gnotobiotic pigs.** Vet. Microbiol., v. 6, p. 69-77, 1981.

JOENS, L. A., MARQUEZ, R., HALTER, M. **Comparison of outer membrane fractions of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*.** Vet. Microb., v. 35, p. 119-132, 1993.

JOHNSTON, T., DUHAMEL, G. E., DEWEY, C. et al. **Recent advances in diagnosing and controlling porcine colonic spirochetosis caused by *Serpulina pilosicoli*.** Compend. Con. Edu. Pract. Vet., v. 21, p. 198-209, 1999.

KARLSSON, M., ASPÁN, A., LANDÉN, A. et al. **Further characterization of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* isolates with decreased susceptibility to tiamulin.** J. Med. Microbiol., v. 53, p. 281-285, 2004.

KENNEDY, M. J., ROSNICK, D. K., ULRICH, R. G. et al. **Association of *Treponema hyodysenteriae* with Porcine Intestinal Mucosa.** J. Gen. Microbiol., v. 134, p. 1565-1576, 1988.

KINYON, J. M., HARRIS, D. L. & GLOCK, R. D. **Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from experimentally infected pigs at various intervals post-inoculation.** In: Proc. 6th Congr. Int. Pig Vet. Soc., 232p., 1980.

KOMAREK, V., MADERNER, A., SPERGSE, J. et al. **Infections with weakly haemolytic *Brachyspira* species in pig with miscellaneous chronic diseases.** Vet. Microbiol., v. 134, p. 311-317, 2009.

LA, T., PHILLIPS, N. D. & HAMPSON, D. J. **Development of a Duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces.** J. Clin. Microbiol., v. 41, n. 7, p. 3372-3375, 2003.

LA, T., COLLINS, A. M., PHILLIPS, N. D. et al. **Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces.** Letters in Applied. Microbiol., v. 42, p. 284-288, 2006.

LADINIG, A., SOMMERFELDSTUR, I., WEISSENBOCK, H. **Comparative evaluation of diagnostic methods for *Lawsonia intracellularis* Infection in Pigs, with emphasis on cases lacking characteristic lesions.** J. Comp. Path., v. 140, n. 2-3, p. 140-148, 2009.

LEE, J. I., McLAREN, A. J., LYMBERY, A. J. et al. **Human intestinal spirochetes are distinct of *Serpulina hyodysenteriae*.** J. Clin. Microbiol., v. 31, p. 16-21, 1993a.

LEE, J. I., HAMPSON, D. J., COMBS, B. G. et al. **Genetic relationships between isolates of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*, and comparison of methods for their subspecific differentiation.** Vet Microbiol, v. 34, p. 35-46, 1993b.

LIEBLER-TENORIO, E. M., POHLENZ, J. F. & WHIPP S. C. Diseases of the Digestive System. In: **Diseases of Swine**. 9. ed., Edited by: STRAW, B. E., ZIMMERMAN, J. J., D'ALLAIRE, S. et al. Ames, Iowa, Blackwell Publishing, cap. 57, p. 821-832, 2006.

LUNA, L. G. Routine Staining Procedures. In: LUNA, L. G. (Ed). **Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology**. New York: McGraw- Hill Book Co, p. 24-58, 1968.

MENIN, A., RECK, C., SOUZA, D. et al. **Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.** Ciência Rural, v. 38, n. 6, p. 1687-1693, 2008.

MOLLER, K., JENSEN, T. K., JORSAL, S. E., et al. **Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs.** Vet. Microbiol., v. 62, p. 59-72, 1998.

MOTRO, Y., LA, T., BELLGARD, M. I. et al. **Identification of genes associated with prophage-like gene transfer agents in the pathogenic intestinal spirochaetes *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira intermedia*.** Vet. Microbiol., v. 134, p. 340–345, 2009.

MUNIAPPA, N., DUHAMEL, G. E., MATHIESEN, M. R. et al. **Light and ultrastructural changes in the ceca of chickens inoculated with human and canine *Serpulina pilosicoli*.** Vet. Pathol., v. 33, p. 542-550, 1996.

MUNIAPPA, N., MATHIESEN, M. R., DUHAMEL, G. E. **Laboratory identification and enteropathogenicity testing of *Serpulina pilosicoli* associated with porcine colonic spirochetosis.** J. Vet. Diagn. Invest., v. 9, p. 165-171, 1997.

NABUURS, M. J. A. **Thermostable factor(s) in soya producing a net excess of secretion in the ligated gut test in pigs.** Vet. Res. Commun., v. 10, p. 399-405, 1986.

NARESH, R. & HAMPSON, D. J. **Attraction of *Brachyspira pilosicoli* to mucin.** Microbiology, v. 156, p. 191-197, 2010.

NEEF, N. A., MCORIST, S., LYSONS, R. J., et al. **Development of large intestinal attaching and effacing lesions in pigs in association with the feeding of a particular diet.** Infect. Immun., v. 62, p. 4325-4433, 1994a.

NEEF, N. A., LYSONS, R. J., TROTT, D. J. et al. **Pathogenicity of porcine intestinal spirochetes in gnotobiotic pigs.** Infect. Immun., v. 62, p. 2395-2403, 1994b.

NEVES S. M. N. **Avaliação das técnicas de isolamento, reação em cadeia da polimerase e hibridização fluorescente in situ para diagnóstico de *Brachyspira* sp. em suínos.** Belo Horizonte, 50p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

NOVOTNÁ, M. & ŠKARDOVÁ, O. ***Brachyspira hyodysenteriae*: detection, identification and antibiotic susceptibility.** Veterinary Medicine – Czech, v. 47, n. 4, p.104–109, 2002.

OCHIAI, S., ADACHI, Y. & MORI, K. **Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* comb. nov., *Brachyspira innocens* comb. nov. and *Brachyspira pilosicoli* comb. nov.** Microbiol. and Immun., v. 4, p. 445-452, 1997.

OXBERRY, S. L. & HAMPSON, D. J. **Colonization of pet shop puppies with *Brachyspira pilosicoli*.** Vet. Microbiol. v. 93, p. 167-174, 2003.

PAULOVICH, F. B., BOROWSKI, S. M., DRIEMEIER, D. et al. **Avaliação da patogenicidade de amostras de *Brachyspira pilosicoli* através de técnicas histopatológicas convencionais e por imuno-histoquímica.** Pesq. Vet. Bras., v. 24, n. 2, p. 144-148, 2004.

PHILLIPS, N. D., LA, T., ADAMS, P. J. et al. **Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira pilosicoli* in feral pigs.** Vet. Microbiol., v. 134, p. 294-299, 2009.

PLAWINSKA, J., JAKUBOWSKI, T., RZEWUSKA, M. et al. **Occurrence of *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira* spp. infection in swine suffering from diarrhea.** In Proc. 18th Congr. Int. Pig Vet. Soc., 287p, 2004.

PROHÁSZKA, L. & LUKACS, K. **Influence of the diet on the antibacterial effect of volatile fatty acids and on the development of swine dysentery.** Zentr. fur Veterinär. B., v. 31, p. 779-785, 1984.

RÅSBÄCK, T., FELLSTRÖM, C., GUNNARSSON, A. et al. **Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*.** J. Microbiol. Meth., v. 66, p. 347-353, 2006.

RÅSBÄCK, T., JANSSON, D. S., JOHANSSON, K.-E. et al. **A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov.** Environm. Microbiol., v. 9, n. 4, p. 983–991, 2007.

SIBA, P. M., PETHICK, D. W., HAMPSON, D. J. **Pigs experimentally infected with *Serpulina hyodysenteriae* can be protected from developing swine dysentery by feeding them a highly digestible diet.** Epidem. Infect., v. 116, p. 207-216, 1996.

SOBESTIANSKY, J. **Clínica e Patologia Suína.** Goiânia: Gráfica Art3, 464p., 1999.

SOBESTIANSKY, J., BARCELLOS, D. E. S. N. (Eds) **Clínica Veterinária em sistemas intensivos de produção de suínos e relatos de casos clínicos.** Goiânia: Art 3, 103p., 2001.

STANTON, T. B. **Proposal to change the genus designation *Serpula* to *Serpulina* gen. nov. containing the species *Serpulina hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpulina innocens* comb. nov.** Int. J. Syst. Bacteriol., v. 42, p. 189-190, 1992.

STANTON, T. B., FOURNIE-AMAZOUZ, E., POSTIC, D. et al. **Recognition of two new species of intestinal spirochetes: *Serpulina intermedia* sp. nov. and *Serpulina murdochii* sp. nov.** Int. J. Syst. Bacteriol., v. 47, p. 1007-1012, 1997.

STANTON, T. B. The genus *Brachyspira*. In: **The Prokaryotes**. Edited by: FALKOW S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K. H., STACKEBRANT E. SPRINGER, New York, 7, 330-56, 2006.

STEGE, H., JENSEN, T. K., MÜLLER, K. et al. **Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds**. Prev. Vet. Med. v. 46, p. 279-292, 2000.

TAYLOR, D. J. & ALEXANDER, T. J. L. **The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete**. Braz. Vet. J., v. 11, p. 58-61, 1971.

TAYLOR, D. J. **Studies of bacteria associated with swine dysentery**. Ph.D. Thesis. University of Cambridge, Cambridge, England, 1972.

TAYLOR, D. J., SIMMONS, J. R., LAIRD, H. M. **Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from *Treponema hyodysenteriae***. Vet. Rec., v. 106, p. 326-332, 1980.

TAYLOR, D. J., TROTT, D. J. Porcine intestinal spirochaetosis and spirochaetal colitis. In: HAMPSON, D. J. & STANTON, T. B (Ed). **Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans**. 1. ed. Wallingford, Oxon: CAB International, cap. 8, p. 211-241, 1997.

THOMAS, W., SELWOOD, R. **Monoclonal antibodies to a 16 kDA antigen of *Serpulina (Brachyspira) hyodysenteriae***. J. Med. Microbiol., v. 37, p. 214-220, 1992.

THOMSON, J. R., SMITH, W. J., MURRAY, B. P. **Investigations into field cases of porcine colitis with particular reference to infection with *Serpulina pilosicoli***. Vet. Rec., v. 142, p. 235-239, 1998.

THOMSON, J. R., SMITH, W. J., MURRAY, B. P. et al. **Porcine enteric spirochete infections in the UK: Surveillance data and preliminary investigation of atypical isolates**. Anim. Health. Res. Rev., v. 2, p. 31-36, 2001.

TROTT, D. J., McLAREN, A. J. HAMPSON, D. J. **Pathogenicity of human or porcine intestinal spirochetes in day old specific pathogen free chicks: an animal model for animal spirochetosis**. Infec. Immun., v. 63, n. 9, p. 3705-3710, 1995.

TROTT, D. J., HUXTABLE, C. R., HAMPSON, D. J. **Experimental Infection of Newly Weaned Pigs with Human and Porcine Strains of *Serpulina pilosicoli*.** *Infect. Immun.*, v. 64, n. 11, p. 4648–4654, 1996.

TROTT, D. J., COMBS, B. G., MIKOSZA, A. S. J. et al. **The prevalence of *Serpulina pilosicoli* in humans and domestic animals in the Eastern High lands of Papua New Guinea.** *Epidemiol. Infect.*, v. 119, p. 369-379, 1997.

TROTT, D. J., ALT, D. P., ZUERNER, R. L. et al. **The search for *Brachyspira* outer membrane proteins that interact with the host.** *An. Health. Res. Rev.*, v. 2, n. 1, p. 19-30, 2001.

VANUCCI, F. & GEBHART, C. **Disenteria suína: Reemergência global e identificação de novas espécies** In: VIII SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA. Porto Alegre. Anais, p. 141-147, 2013.

VIOTT, A. M. **Prevalência de enteropatógenos em suínos de recria/terminação em Minas Gerais e desenvolvimento de modelo experimental de *Lawsonia intracellularis* em camundongos (*Mus musculus*).** Belo Horizonte, 72p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

VIOTT, A. M., LAGE, A. P., CRUZ JR. et al. **The prevalence of swine enteropathogens in Brazilian grower and finish herds.** *Braz. J. Microbiol.*, v. 44, n. 1, p. 145-151, 2013.

WARTH, J. F. G., KLUPPEL, M. E. A. & DITTRICH, T. R. C. **Diagnóstico da disenteria suína no Estado do Paraná.** In: Anais II Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Rio de Janeiro, 109, 1985.

WEISSENBOCK, H., MADERNER, A., HERZOG, A. M. et al. **Amplification and sequencing of *Brachyspira* spp. Specific portions of *nox* using paraffin-embedded tissue samples from clinical colitis in Austrian pigs shows frequent solitary presence of *Brachyspira murdochii*.** *Vet. Microb.*, v. 111, p. 67-75, 2005.

WHIPP, S. C., ROBINSON, I. M., HARRIS, D. L. et al. **Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs.** *Infect. Immun.*, v. 26, p. 1042-1047, 1979.

ZHANG, P., WITTERS, N. A., DUHAMEL, G. E. Identification of *Serpulina pilosicoli* outer membrane antigens (SPOMA) by western blot analysis of human isolate SP 16 with convalescent and hyperimmune swine soro. In: PAUL, P. S., FRANCIS, D. H., BENFIELD, D. (Eds). **Mechanisms in the pathogenesis of enteric diseases**. Washington: Plenum, p. 39-57, 1998.